

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

UNIDAD DE POST-GRADO

**Efecto de la Neomicina B sobre la transcripción y
replicación del Rotavirus tipo A**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Salud animal

AUTOR

Alberto Gustavo Manchego Sayan

Lima – Perú

2009

*A mis padres Antonio y Esperanza,
por su amor y apoyo continuo
durante toda mi vida.
Papá, nunca te olvidaré,
seguirás vivo mientras yo viva.*

*A Nieves, mi esposa, por darme el amor
y apoyo que necesito para seguir viviendo.*

*A mis hijos Gustavo y Sebastian,
los seres más importantes en mi vida,
gracias por darme la razón
de seguir esforzándome en mejorar.*

*A mis hermanos: Antonio, Gloria y Enrique
Por darme ese afecto fraterno tan necesario
para formar a una persona íntegra y feliz.*

Debo agradecer a las personas que de una u otra manera apoyaron en finalizar esta tesis:

- Dr Eugenio Spencer, Dra Ana María Sandino y Dr Jonás Chnaiderman, profesores y amigos de Chile que dejaron profundas enseñanzas en mi persona y apoyaron la ejecución de los experimentos de este trabajo.
- Dra Hermelinda Rivera y Raúl Rosadio que me apoyaron en la redacción y sustentación de la tesis.
- A los amigos y colegas: Kim Lam Roxana Chiok, Miguel Rojas, Juan More, Giovanni Pérez, Víctor Roca, Mercy Ramírez, Cesar Lázaro, Luis Hoyos y Juan Siuce por su amistad.
- A todos mis tesistas que me piden que se enseñe con el ejemplo de vida.
- A mis amores: Nieves Sandoval, Gustavo Manchego y Sebastian Manchego, por su amor y su presencia en mi vida, y por recordarme que no deje de cumplir las metas.

A todos, muchas gracias.

INDICE

RESUMEN

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1.	Generalidades	3
2.2.	Ciclo infectivo	4
2.2.1.	Adherencia y penetración viral.	4
2.2.2.	Síntesis de RNA virales	4
2.3.	Sistema de transcripción y de replicación <i>in vitro</i>	7
2.4.	Antibióticos aminoglucósidos y su acción antiviral	8
2.5.	Antecedentes del presente trabajo	10
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	13
3.1.	Reactivos	13
3.2.	Soluciones	13
3.3.	Cepas virales	14
3.4.	Cultivo de células	14
3.5.	Infección y propagación de cepas virales de rotavirus	14
3.6.	Purificación de partículas virales	15
3.7.	Síntesis <i>in vitro</i> y purificación de mRNAs totales de rotavirus	17
3.8.	Ensayos de replicación <i>in vitro</i>	18
3.9.	Electroforesis y tinción de RNAs	18
3.10.	Ensayos de inhibición de multiplicación viral <i>in vivo</i> por neomicina	19
3.11.	Ensayos de transcripción e inhibición de transcripción <i>in vitro</i> por aminoglucósidos	19
3.12.	Protección de mRNA por acción de RNasa	20
IV.	RESULTADOS	22
4.1.	Efecto de la neomicina sobre la replicación viral	22
4.2.	Inhibición de la replicación <i>in vivo</i> por neomicina B	24
4.3.	Efecto de la neomicina B en la replicación viral	25
4.4.	Efecto de la neomicina B sobre la síntesis de dsRNA de los diversos segmentos genómicos	29
4.5.	Efecto de la neomicina B sobre la síntesis de hebra negativa	29

4.6. La presencia de tRNA afecta la inhibición de neomicina en la síntesis de la hebra negativa	34
4.7. Protección de la neomicina B a distintas regiones del mRNA rotaviral de la acción de nucleasa micrococal	35
4.8. Efecto de aminoglucósidos sobre la transcripción <i>in vitro</i> de rotavirus	41
4.9. La neomicina no afecta el centro catalítico de la polimerasa viral	41
4.10. Formación de transcritos subgenómicos virales durante la transcripción <i>in vitro</i> de rotavirus	46
4.11. La neomicina B y otros aminoglucósidos afectan el inicio de la transcripción	47
4.12. Neomicina afecta la elongación de los transcritos subgenómicos	48
 V. DISCUSIÓN	 56
 VI. CONCLUSIONES	 68
 VII. BIBLIOGRAFÍA	 69
 VIII. APÉNDICE	 77

RESUMEN

Se ha demostrado que los antibióticos aminoglucósidos interactúan con varias moléculas de ARN al unirse a regiones con estructuras secundarias. Varios reportes indican que la neomicina B puede inhibir la replicación del VIH y otros virus ARN. El genoma rotaviral consiste de 11 segmentos de ARN de doble hebra, la replicación viral emplea ARN cadena positiva (ARNm) como templado para la síntesis de ARN de cadena negativa. Se ha determinado que señales existentes en *cis* del ARNm son necesarias para la replicación al involucrar secuencias y conformaciones esenciales para el reconocimiento de la polimerasa viral. Debido a que se requieren dos pasos para la síntesis de ARN para la morfogénesis del virus, se ha estudiado los efectos de neomicina B y otros aminoglucósidos en la transcripción y/o replicación del genoma viral. Los resultados demuestran que neomicina B a concentraciones de 3mM inhiben la replicación in vivo de rotavirus en células MA104. Se determinó que neomicina B a concentraciones de 125 μ M logra casi 100% de inhibición en los "open core" donde se observa tanto transcripción y síntesis de cadenas negativas (síntesis de ARN de doble hebra). El estudio de la naturaleza de la inhibición mostró que los 11 segmentos del genoma viral tenían una sensibilidad diferencial a la droga, siendo los segmentos 2, 3 y 4 más sensibles. El sistema "open core" permitió la síntesis de cadenas negativas usando ARNm de rotavirus exógeno como templado. En experimentos donde se adicionó neomicina, se obtuvo una inhibición total de la síntesis de cadenas negativas dependientes del templado exógeno sobre la síntesis endógena. Se estudió el efecto de neomicina en la transcripción (síntesis de cadena positiva) en un sistema *in vitro*; donde concentraciones de 12mM resultaron completamente inhibitorias afectando el inicio y elongación de los 11 segmentos genómicos, observado mediante una estrategia de pulso y cacería ("pulse and hunting") y electroforesis en gel de poliacrilamida-urea al 30%. Una prueba de protección del RNA a la acción de enzimas nucleasas permitió determinar la interacción neomicina-ARNm viral. Estos resultados

indican que la neomicina B interactúa tanto con ARN una hebra como con ARN doble hebra de los rotavirus, pero tiene mayor afinidad por ARN una hebra produciendo inhibición de la replicación. La afinidad diferencial para ambos ARN podría explicarse mediante la presencia de ARNm rotaviral en el sitio de unión a neomicina, similar a la presente en TAR RNA del VIH, uniéndose a secuencias y/o estructuras secundarias en el ARNm previniendo que el ARN viral polimerice la síntesis de ARN hebra simple.

Palabras claves: Rotavirus, aminoglucósidos, neomicina, transcripción viral, replicación viral,

ABSTRACT

The aminoglycosides antibiotics have been shown to interact with various RNA molecules binding to regions with secondary structure. Reports indicate that neomycin B may inhibit the replication of HIV and other RNA viruses. The rotavirus genome consists of 11 segments of double-stranded RNA, viral replication uses as template the plus-strand RNA (mRNA) for minus-strand RNA synthesis. Has been determinate that existent signals *in cis* in the mRNA necessities for the replication that involvement sequences and conformations essential for the recognition the polymerase viral. Since two different RNA synthesis step are involve in the morphogenesis of the virus the effect of neomycin B and other aminoglycosides was studied in both transcription and/or replication of the viral genome. The results show that concentrations of 3 mM of neomycin B inhibited the rotavirus replication *in vivo* on MA104 cells. In open cores where both transcription and minus strand synthesis (double stranded RNA synthesis) could be observed, it was determined that near a 100% inhibition was obtained with concentration 125 μ M neomycin B. The study of the nature of the inhibition showed that the 11 segments of viral genome had a differential sensibility to the drug, segment 2, 3, 4 and 5 were more sensitive. The open core system allowed minus strand synthesis using as template exogenous rotavirus mRNA. In experiments where neomycin B was added, a total inhibition of the minus strand synthesis dependant of the exogenous template was obtained over the endogenous synthesis. The effect of neomycin in transcription (plus strand synthesis) was studied *in vitro* system; concentrations of 12 mM were fully inhibitory affecting the start and elongation of 11 genomic segments, observed by pulse and hunting strategy and polyacrylamide –urea gel 30% electrophoresis. Protection a nuclease test allowed to determined interaction neomycin –viral mRNA. These results indicate that the neomycin B interacts with single strand RNA as well as double strand RNA of rotavirus, but has highest affinity for

single strand RNA producing inhibition of replication. The differential affinity for both RNA could be explain by the presence in rotavirus mRNA of a neomycin binding site, similar to the one present in TAR RNA of HIV, binding to a sequence and/or secondary structure in the mRNA preventing than the viral RNA polymerize synthesis of minus-strand RNA.

Key words: Rotavirus, viral transcripción, viral replicación, aminoglycósides, neomycin

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Efecto de distintas concentraciones de neomicina sobre la formación de unidades formadoras de placa (UFP) de rotavirus SA11-4F en células MA-104.	23
Figura 2.	Efecto citotóxico de neomicina B en células MA 104.	24
Figura 3.	Efecto de neomicina B sobre la replicación del Rotavirus cepa SA11-4F en células MA104.	27
Figura 4.	Efecto de neomicina B sobre la replicación de rotavirus.	28
Figura 5.	Efecto inhibitorio de la síntesis de los distintos segmentos genómicos de rotavirus por la neomicina B.	31
Figura 6.	Efecto de la neomicina sobre la síntesis de la hebra negativa teniendo como templado el mRNA exógeno.	32
Figura 7.	Síntesis de dsRNA en presencia y ausencia de mRNA y neomicina.	33
Figura 8.	Síntesis de dsRNA teniendo como templado el mRNA exógeno en presencia del análogo de nucleótido 2',3' dialdehído adenosina 5'trifosfato (2',3'dialdehído ATP).	34
Figura 9.	Efecto de neomicina B sobre la acción de tRNA de levadura en la replicación de rotavirus.	37
Figura 10.	Protección de neomicina B al mRNA rotaviral por acción de la RNasa micrococal.	38
Figura 11.	Protección de los transcriptos subgenómicos asociados a subpartícula viral por la neomicina B, a la acción de la nucleasa micrococal.	39
Figura 12.	Protección del mRNA viral a la acción de la RNasa micrococal por la neomicina B en presencia de tRNA.	40
Figura 13.	Efecto de aminoglucósidos sobre la transcripción <i>in vitro</i> de rotavirus SA11-4f. Panel A.	43
Figura 14.	Efecto de la neomicina B sobre la transcripción <i>in vitro</i> de rotavirus.	44
Figura 15.	Transcripción <i>in vitro</i> de Rotavirus SA11 en presencia de neomicina B y distintas concentraciones de Cloruro de Magnesio.	45
Figura 16.	Formación de transcriptos pequeños en durante la Transcripción	49

in vitro.

Figura 17.	Los transcritos de tamaño pequeño están asociados a la partícula.	50
Figura 18.	Transcritos subgenómicos son precursores de los mRNAs rotavirales.	51
Figura 19.	Efecto de la neomicina B sobre el inicio de transcripción.	52
Figura 20.	Efecto de diversas concentraciones de neomicina B sobre el inicio de la transcripción.	52
Figura 21.	Efecto de los aminoglucosidos sobre el inicio de transcripción.	53
Figura 22.	Cuantificación de los efectos de diversos aminoglucosidos sobre la producción de transcritos subgenómicos.	54
Figura 23.	Neomicina B afecta la elongación de transcritos pequeños.	55

LISTA DE ANEXOS

Cuadro A1.	Abreviaturas usadas en el estudio	77
-------------------	-----------------------------------	----

I. INTRODUCCIÓN

El rotavirus es un agente viral que causa problemas diarreicos en animales domésticos y en los humanos con amplia diseminación a nivel mundial. Desde su identificación asociada a diarreas hasta la actualidad sigue aun produciendo alta morbilidad y mortalidad en los neonatos de las especies animales a pesar del desarrollo de diversos tipos de vacunas. Siendo una de sus características, el generar infecciones agudas localizadas en el tracto intestinal con gran diseminación viral debido a su eficiente producción de viriones infectivos. Esta característica está determinada por la alta eficiencia de los eventos de transcripción y replicación viral dentro de la célula infectada, sin embargo estos mecanismos que determinan esta eficiencia no están totalmente esclarecidos, sin embargo existen estudios que determinan que la misma RNA polimerasa viral dependiente de RNA participa en estos eventos, para lo cual necesita señales distintas para formar una simple hebra de RNA o una doble cadena de RNA, estructura establecida en su genoma viral del virión infectivo. Siendo algunos eventos biológicos de estos mecanismos blancos para paralizar la maquinaria de transcripción y/o replicación viral, en el presente trabajo se estudió el efecto de los aminoglucósidos, sobre todo de la neomicina B, sobre la transcripción y replicación del rotavirus *in vitro* y *ex vivo* debido a su capacidad de unirse a RNA estructurados. Estos hallazgos nos permitirán establecer posibles

estrategias terapéuticas como para el estudio de mecanismos biológicos de transcripción y replicación viral de virus RNA.

II. REVISION BIBLIOGRÁFICA

2.1. Generalidades

Los rotavirus son un género viral dentro de la Familia Reoviridae y son los principales agentes causales de gastroenteritis aguda, tanto en el hombre como en una gran variedad de animales (Bern y col., 1992, Dodet y col., 1997). La partícula viral no tiene envoltura y su tamaño varía entre 70 – 100 nm. Tiene una cápside compuesta de tres capas proteicas, conteniendo todas las enzimas para la síntesis del mRNA. El genoma es un RNA de doble hebra (dsRNA) de 11 segmentos (Prasad y col., 1996).

La capa proteica externa de la cápside viral está compuesta por las proteínas VP7 y VP4. Estas dos proteínas son importantes para la adherencia y penetración del virus a la célula huésped (Coulson, 1996; Coulson y col., 1997), actuando también como antígenos virales en una respuesta inmune, determinando los diversos serotipos encontrados en infecciones en distintas especies animales (Hoshino y col., 1983). La capa intermedia está constituida por la proteína VP6 (Bican y col., 1982), que es necesaria para la actividad transcriptasa de la partícula (Sandino y col., 1986), además de ser altamente inmunogénica (Bican y col., 1982). La cubierta más interna está formada por las proteínas VP2, VP1 y VP3; la cual es denominada como el núcleo o core viral, en cuyo interior se encuentra ubicado el genoma viral (Prasad y col., 1988).

La VP1, es la RNA polimerasa RNA dependiente, que cataliza tanto la síntesis del mRNA (transcripción), así como a la hebra negativa teniendo como templado el mRNA, para generar el RNA de doble hebra (replicación) (Valenzuela y col., 1991; Patton y Gallegos, 1988). La VP3 es la guanidil y metiltransferasa que sintetiza el “cap” del mensajero viral (Pizarro y col., 1991, Vásquez y col., 1993).

2.2. Ciclo infectivo

2.2.1. Adherencia y penetración viral.

El receptor que permite la adherencia del rotavirus a las células epiteliales del duodeno y a las líneas celulares permisibles para su multiplicación, aun no está plenamente identificado; sugiriéndose la participación de glicolípidos y glicoproteínas que contienen moléculas de ácido siálico (Fukudome y col., 1989); sin embargo, existen cepas de adherencia independientes de ácido siálico. Se ha determinado a la integrina $\alpha_2\beta_3$ como receptor post-adherencia común para todas las cepas de rotavirus, y que estaría involucrada en la penetración viral (Guerrero y col., 2000). Se postula una penetración viral directa con cambios de permeabilidad en la membrana celular y fusión de membranas celulares (Kaljot y col., 1988; Falconer y col., 1995), sin embargo existen evidencias que el rotavirus puede penetrar a través de una ruta endocítica en cuyo interior del endosoma se tiene bajas concentraciones de calcio que permite la desestabilización de la membrana endosomal y la solubilización las proteínas de la capa externa de la cápside produciéndose una partícula de doble que es liberada al citoplasma celular (Ruiz y col., 2000, Chemello y col., 2002).

2.2.2. Síntesis de RNA virales

La partícula de doble cubierta una vez libre en el citoplasma, tiene la capacidad de funcionar como un complejo transcripcional y sintetizar los mRNA de cada uno de los 11 segmentos genómicos virales, teniendo como templado dsRNA viral (Estes, 1996).

Los mRNAs virales sintetizados, son extruidos a través de canales existentes en los vértices de las partículas, que atraviesan las capas proteicas formadas por VP6 y VP2 (Lawton y col., 1997).

Durante las primeras horas de infección viral en la célula, se observa una producción de mRNA virales que se va incrementando hasta llegar a una máxima síntesis a las 9 a 12 horas post infección (Stacy-Phipps y Patton, 1987) sugiriendo que las subpartículas de doble cubierta tienen una elevada actividad transcriptasa. Se ha determinado que el dsRNA esta en estrecha unión con las proteínas del core. La VP2 parecer ser la proteína que forma la plataforma necesaria para que la VP1 este unida al dsRNA (Prasad B y col., 1996), por lo tanto, es necesaria para este proceso (Patton y col., 1997).

Los mRNAs virales producidos presentan la estructura “cap” en el extremo 5’ pero son no poliadenilados en su extremo 3’ (Imai y col., 1983; Spencer y García, 1984). Estos mRNA virales son usados por la maquinaria traduccional de la célula para la síntesis de las proteínas virales tanto estructurales como las no estructurales y también para la replicación viral, sirviendo como templado para la síntesis de dsRNA genómico (Patton y Gallegos, 1988).

La síntesis del genoma viral ocurre en el citoplasma, en los denominados viroplasma, en donde se encuentran concentradas las proteínas virales estructurales VP2 y VP6 (Petrie y col., 1984) y las no estructurales NSP2 y NSP5 (Aponte y col., 1996; Poncet, 1997). Las proteínas virales VP1 y VP3 sintetizadas en un primer evento, interactúan con los mRNAs virales formando pre-cores, que al unírseles VP2 forma el core viral; siendo estos intermediarios de la replicación, sensibles al tratamiento con RNAsas. Estos cores tienen la capacidad de sintetizar la hebra negativa complementaria al mRNA y generar el RNA de doble hebra genómico

produciéndose un core viral maduro que es resistente a RNAsas (Helmberger-Jones y Patton, 1986; Gallegos y Patton, 1989; Patton y Gallegos, 1990).

Se presume que la proteína involucrada en dirigir a los mRNA virales hacia la síntesis del genoma viral es la NSP5, esta tiene propiedades reguladoras similares a otras fosfoproteínas virales (Poncet, 1997; Gonzales y col., 1998; Patton 1995, Barber y col., 1998). En un modelo propuesto por Chnaiderman (2002), la NSP5 interactuaría con NSP2, a la cual también se les ha determinado propiedades de unión a RNA, y estas dos proteínas en forma de multímeros secuestrarían los mRNA virales formando el viroplasma, en donde ocurriría la síntesis de la hebra negativa del genoma. En la ausencia de esta estructura y en presencia de la NSP3, proteína que tiene la propiedad de unirse en forma específica a la secuencia GACC del extremo 3' de los mRNAs virales (Piron y col., 1998), el mensajero viral es utilizado para la traducción (Vende y col., 2000).

Durante la morfogénesis del Rotavirus, se ha observado un eficiente ordenamiento de los 11 segmentos del genoma viral y no ha sido posible detectar dsRNA viral libre dentro de la célula infectada, indicando que el proceso de síntesis de la doble hebra y el empaquetamiento del material genómico ocurren simultáneamente; debiendo existir un proceso de reconocimiento de los segmentos, que permita empaquetar una copia de cada gen en una nueva partícula (Patton, 1995; Patton y Spencer, 2000).

El complejo proteico formado por VP1 y VP2, tiene la actividad RNA polimerasa dependiente de RNA (Patton y col, 1997); mientras la VP1 tiene una similitud de secuencias con motivos consenso de posibles RNA polimerasas RNA dependiente de otros virus (Eiden y Hirshon, 1993; Fukuhara y col., 1989), la VP2 es una proteína de alta afinidad a RNA de una hebra (Boyle y Holmes, 1986) y sería la proteína que estabiliza al mRNA en su unión con la VP1. La misma VP1 que cataliza la síntesis de

los mRNAs (transcripción), cataliza la síntesis de la hebra negativa teniendo como molde al mRNA.

Los mRNAs de rotavirus, contienen regiones no traducibles (UTR) de un largo variable en los extremos 5' y 3' que son flanqueadas por secuencias comunes para cada grupo viral. En el grupo A, la secuencia consenso en la mayoría de los segmentos es 5'-GguuUaaaa-3' en el extremo 5' y 5'-AugUGaCC-3' en el extremo 3', los residuos que están en mayúsculas aparecen en los 11 segmentos virales y los que están en minúsculas se hallan en 8 de los 11 mensajeros (Wentz y col., 1996; Chen y Patton, 1998). En los rotavirus del grupo C, la secuencia consenso del 3' final es UGGCU (James y col. 1999), no habiéndose observado rearrreglos genéticos entre las cepas de los serogrupos A y C (Poncet y col., 1994). La secuencia consenso del UTR 5' no es necesaria para la síntesis de la hebra negativa, pero la hace más eficiente (Chen y Patton, 1998); mientras que algunos nucleótidos específicos del extremo 3' son necesarios para que ocurra la síntesis de la hebra negativa (Wentz y col., 1996; Chen y Patton, 1998; Patton y col., 1996). La predicción de estructuras secundarias tipo tallo horquilla y tipo "panhandles" de los mRNA virales por análisis computacional indicarían que la conformación del mRNA serían señales específicas reconocibles por las proteínas virales que conforman el complejo replicativo (Patton y col., 1996).

2.3. Sistema de transcripción y de replicación *in vitro*

El tratamiento de la partícula viral con sustancias quelantes como el EDTA, permite disociar las proteínas de la capa externa (VP7 y VP4) obteniendo una subpartícula viral con capacidad transcriptasa, llamada partícula de cubierta simple y que es utilizada en el sistema de transcripción *in vitro* (Cohen y col., 1979; Pizarro y col., 1991; Spencer y García, 1984). Cuando la subpartícula viral es tratada con agentes caotrópicos (CaCl₂), se obtiene una subpartícula viral denominada "core viral" que

puede ser abierto al incubarse en un buffer hipotónico. Esta subpartícula poseen una actividad replicasa (síntesis de la hebra negativa) que se emplea en el sistema de síntesis de la hebra negativa libre de células y dependiente de templado, desarrollado por Chen y colaboradores (1994). En este sistema, los núcleos abiertos o 'open cores' en un medio de reacción adecuado, utilizan su genoma para la síntesis de nuevas moléculas de dsRNA, en un proceso conocido como replicación endógena. Se ha determinado que el proceso de replicación es específico al RNA de rotavirus, ya que cuando se la agrega RNA doble hebra de otro origen (por ejemplo el genoma de otro virus RNA doble hebra) al sistema, estos no son utilizados por los "open cores" y no se observa dsRNA *de novo*. Los "open cores" también catalizan la síntesis *de novo* de la cadena negativa sobre un mRNA añadido de manera exógena. Así, utilizando mRNAs virales que contienen deleciones o cambios nucleotídicos en sitios específicos respecto a la secuencia viral normal, ha permitido identificar diferentes características de los mRNAs de rotavirus que participan en la síntesis de la cadena negativa del dsRNA viral (Patton, 1996; Wentz, 1996).

2.4. Antibióticos aminoglucósidos y su acción antiviral

Los antibióticos aminoglucósidos son compuestos de azúcares hidrofílicos multifuncionales que poseen varios residuos amino e hidroxilos funcionales. Los residuos aminos son mayormente protonados en medios biológicos, así estos antibióticos son policationes que muestran una afinidad de unión para ácidos nucleicos (Kotra y col., 2000). Son ampliamente usados en terapia y son reconocidos que interactúan con una gran variedad de diferentes RNA, siendo potentes inhibidores de la interacción de proteínas y regiones del RNA (Schroeder y col., 2000).

Del grupo de aminoglicosidos, se ha determinado que la neomicina B tiene efectos antivirales inhibiendo la replicación *in vivo* del virus de inmunodeficiencia adquirida humana (HIV), bloqueando selectivamente la unión de las proteínas Rev y Tat a las regiones RRE y TAR del RNA viral, respectivamente (Zapp y col., 1993; Cho y Rando R, 1999; Wang y col., 1998), unión que regula la expresión de genes virales.

Rev es una proteína que se une específicamente a la secuencia elemento de respuesta de Rev (RRE) incrementando las acumulaciones citoplasmática de transcritos virales (mRNA) que incluyen a los genes gag, pol y env del retrovirus. La secuencia de RRE es un fragmento de 30 nucleótidos que estructuralmente forman un surco con la presencia de una burbuja (“bubble”) interna que esta parcialmente cerrada por dos pares de purinas, que le confiere la especificidad de unión a Rev (Vaishnav y col., 1991). La neomicina B compete con Rev para unirse a la misma región, sin embargo, la regla general de reconocimiento de RNA por neomicina B es aun desconocida (Zapp y col., 1993; Cho y Rando, 1999).

La proteína viral Tat, activa y estabiliza la síntesis completa del mRNA de HIV-1 a través del sitio de unión a la región TAR que comprende a los primeros 57 nucleótidos del transcrito primario de HIV-1. Esta región adopta una estructura “hairpin” con una protuberancia de 3 nucleótidos (UCU) seguido de 4 bases apareadas continuando con un “loop”, uniéndose Tat en el surco mayor (Aboul-ela y col., 1996). Se ha determinado que la neomicina B previene la unión de Tat a la secuencia TAR del aun en concentraciones de 1 μ M, por un mecanismo alostérico, incrementando la proporción de la constante para la disociación del complejo (Faber y col., 2000; Wang y col., 1998).

2.5. Antecedentes del presente trabajo

En muchos virus con genoma RNA positivo, tales como el virus mosaico del trébol (BMV) y virus mosaico de la alfalfa (AIMV) se ha observado una estructura similar a tRNA, necesaria para la iniciación de la replicación (el mRNA se transcribe en un RNA de polaridad negativa que sirve de molde para producir muchos RNA de polaridad positiva que será su genoma). En estos virus se ha determinado que la desestabilización de la conformación de “pseudoknot” en el tallo aceptor aminoacil resulta en una baja actividad del promotor; la sustitución o eliminación de los CC en el 3' terminal elimina la replicación y los nucleótidos en el “loop” del brazo C parecen estar involucrados en una interacción secuencia específica con la replicasa (Chapman y col., 1998; Deiman, 2000).

En rotavirus, existen zonas de reconocimiento comunes en los diversos mRNA, que interactúan con las distintas proteínas virales tanto estructurales como no estructurales (Boyle y Holmes, 1986), para dirigir los diversos eventos del ciclo viral. Así, para una eficiente replicación viral, el mRNA viral tiene que interaccionar con las proteínas virales del core viral, fundamentalmente con VP1 y VP2 (Chen y col., 1994; Patton, 1996). La VP1 se une específicamente a la región UTR 3' del mRNA viral en donde se ha determinado la secuencia consenso mínima que actúa como promotor de la replicación (Wentz y col., 1996) y que esta secuencia debe estar en forma de simple hebra para que se tenga una eficiente síntesis de la hebra complementaria negativa (Chen y Patton, 1998). Con el empleo de oligos antisentido del extremo 3' final de los mRNA virales, se ha comprobado que los nucleótidos finales de este extremo deben estar libres, y que existen otras regiones internas que participan como señales para la eficiencia de la replicación (Chen y col., 2001; Barro y col., 2001). La predicción de la estructura secundaria de estas regiones indican la presencia de diversas formaciones como “panhandle”, y tallo-horquilla que serían señales reconocidas por las proteínas de unión al mRNA viral (Patton y Spencer, 2000; Chen y col., 2001). Además, se ha

observado que la presencia de tRNA de levaduras en el sistema de replicación libre de células, inhibe la replicación de los 11 segmentos de rotavirus aunque el mecanismo exacto de esta inhibición no está claro (Barro, 2002).

Todos estos antecedentes nos indicarían que la estructura que adquiere el mRNA de rotavirus, es esencial para la eficiencia de los eventos de transcripción y replicación viral. Una de las formas de estudiar los procesos de transcripción y replicación viral es utilizando inhibidores específicos que bloqueen un evento de todo el proceso. Así, se ha determinado que diversos análogos nucleósidos y nucleósidos trifosfatos tienen efecto inhibitorio sobre la transcripción y replicación, tanto en vivo como *in vitro*, en forma competitiva con los nucleótidos durante la transcripción y no hay presencia de mRNA viral completo para la replicación (Pizarro y col., 1991 b). Los aminoglucosidos que se unen a diversas moléculas de RNA, produciendo inhibición de su actividad a pesar de tener pocas secuencias homólogas pero si estructurales (Fourmy y col., 1998; Von Ahlsen y col., 1991; Rogers y col., 1996), podrían ser usadas como inhibidores de los procesos de transcripción y replicación en rotavirus. Si bien es cierto que, la transcripción y replicación son realizados por la misma polimerasa, son eventos con mecanismos distintos ya que en la transcripción, la polimerasa se debe unir a un RNA de doble hebra, mientras que en la síntesis de la hebra negativa, el templado es un RNA de una hebra. Además, no existen muchos antecedentes respecto a como VP1 reconoce o interactúa con el RNA doble hebra para formar el mRNA, ni como reconoce e interactúa con el mRNA para la formación del RNA doble hebra, por lo que se hipotetizó que, existen inhibidores específicos de la transcripción y de la replicación de los rotavirus, que pueden ser empleados para determinar la forma del reconocimiento de las señales de los extremos 3' y/o 5' del mRNA de los diversos segmentos genómicos del rotavirus por parte de la RNA polimerasa necesarias para promover la síntesis de la hebra negativa y formar el genoma viral. Para comprobar la hipótesis, se determinó como objetivos de esta tesis

determinar a los inhibidores específicos de la replicación del rotavirus y cual es su mecanismo de acción; en busca de esclarecer el mecanismo del reconocimiento de los mRNA virales por parte de la RNA polimerasa del rotavirus.

III. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. Reactivos.

Lidomicina A.	SIGMA (L 4518)
Neomicina B	GIBCO (21810-031)
Paromomicina	SIGMA (P 9297)
Tobramicina	SIGMA (T 1783)
tRNA levadura	SIGMA (R9001)
Proteinasa K	SIGMA (P6556)
Tripsina	SIGMA (T4799)
[α - ³² P]UTP (3000 Ci/mMol)	NEN Life (Blue507H)

3.2. Soluciones.

Buffer TBS	25 mM Tris-HCl pH 7.4, 137 mM NaCl, 7 mM KCl, 0.7 mM Na ₂ HPO ₄ , 5.5 mM Dextrosa, 1 mM MgCl ₂ , 1mM CaCl ₂ ,
Buffer LSB	2 mM Tris-HCl pH 7.6, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM DTT
Buffer TE	10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA
Buffer TBE	89 mM Tris-HCl pH 8.3, 89 mM ácido bórico, 2mM EDTA
Buffer Tris Glicina	25 mM Tris pH 8.3, 250 mM Glicina
Buffer carga de mRNA 3X	95% Formamida, 0.05% azul de bromofenol, 0.05% xileno-cianol ff, EDTA 20 mM.

Buffer carga Proteína 2X 100 mM Tris pH 6.8, 2% β -mercaptoetanol, 4% SDS, 0.2% azul de bromofenol, 20% glicerol.

3.3. Cepas virales.

Las cepas de rotavirus usadas fueron: SA11–4f proveniente de simio clasificada dentro de Grupo A, serotipo 3 (G), genotipo 1 (P) y serotipo 5B (P); y la cepa reordenante DxRRV (del gen 9) proviene de rotavirus de mono rhesus RRV clasificada en el grupo A, serotipo 3 (G), genotipo 3 (P) y serotipo 5B (P). Estas cepas fueron gentilmente donadas por el Dr. John Patton del NIH, Bethesda, USA.

3.4. Cultivo de células

Para cultivo celular se utilizó la línea celular MA-104, derivada de fibroblastos de riñón de mono verde. Estas células se cultivaron en una densidad de aproximadamente 30×10^3 células por cm^2 en botellas de cultivo Nunctm mantenidas en un medio mínimo de EAGLE (MEM) suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB). A las 24 horas de cultivo se observa una monocapa homogénea que cubre el 95% de la superficie. En las infecciones de rotavirus, el medio es substituido por un MEM sin suero fetal y suplementado 2 μ g de tripsina por 1ml de medio.

3.5. Infección y propagación de cepas virales de rotavirus.

Para la infección celular, las cepas de rotavirus fueron activadas con tripsina a una concentración final de 10 μ g/ml, durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente, el inóculo fue diluido en MEM hasta obtener la multiplicidad de infección (M.O.I.) deseada, medida en u.f.p./cél. Este inóculo (0.2 ml por 25 cm^2 de área celular) fue sembrado en monocapas confluentes previamente lavadas con PBS, e incubadas a 37°C por 1 hora, realizando agitaciones leves cada diez minutos, periodo durante el cual el virus tiene una mayor facilidad para unirse y penetrar a las células, denominado, etapa de

absorción viral. Inmediatamente después, el inóculo es removido y las monocapas son mantenidas en MEM sin suero fetal bovino conteniendo 2 µg/ml de tripsina.

Para la propagación de las cepas virales se utilizó una M.O.I. de 5 u.f.p./cél. Cosechando el medio, cuando se observó un efecto citopático mayor al 80% de las células (24-48 horas). En los experimentos indicados, el proceso de infección fue detenido, por congelamiento a -20°C.

3.6. Purificación de partículas virales.

Primeramente, se infectaron 50 botellas de cultivos de 175 cm² de monocapas de células confluentes de MA-104 como se describe anteriormente. Las infecciones se realizaron utilizando 5 u.f.p./cél y se incubó a 37°C hasta observarse un efecto citopático del 90-100% de la monocapa celular (24 a 30 horas). La cosecha viral (30 ml por botella), se realizó colectando el medio de cultivo conteniendo los restos celulares obtenidos luego de un raspado con un rastrillo de teflón, asegurando la total recuperación de la progenie viral, en tubos cónicos de 50 cc y conservados a -70°C. Luego, se congelaron y descongelaron dos veces, y se juntaron en 3 botellas vidrio de 500ml. A cada botella se le agregó EDTA para obtener una concentración final de 50 mM y se incubó a 37°C durante 1 hora. El medio cosechado es mezclado con triclorotrifluoroetano (freón) frío a una proporción 1:1 en una juguera y la mezcla se agita vigorosamente durante 20 segundos tres veces con intervalos de 3 minutos en hielo. Posteriormente, las fases se separaron mediante centrifugación a 8 000 x g durante 10 minutos a 4°C y se recuperó la fase acuosa. Esta solución fue centrifugada a 30 000 x g durante 2 horas a 4°C, para obtener un pellet formado por el virus concentrado y que fue resuspendido en 4 ml de buffer TBS. Luego, se le agregó CsCl para obtener una concentración final de 1.37g/ml (\cong 2.16g totales de CsCl) y se centrifugó a 160 000 x g

por 18 horas a 10 °C, para obtener una gradiente de densidad cloruro de Cesio (CICs). En esta gradiente, se observa una banda horizontal de color blanco cerca del centro del tubo de centrifuga que contiene las partículas de simple cubierta. Se perforo el fondo del tubo y por goteo se obtuvieron alicuotas de 500µl a los cuales se les midió el índice de refracción a cada una y se escogieron las alicuotas que se encontraban en un rango de 1.393 y 1.382 g/ml de densidad. Para realizar el cálculo de densidad a partir del índice de refracción se utilizó la siguiente fórmula.

$$\rho = (10.8601 \cdot \eta) - 13.4974$$

Las fracciones escogidas fueron mezcladas, se les completó a un volumen final de 4 ml con buffer TBS y se les agregó CsCl para completar hasta una densidad final de 1.37g/ml y se le realizó una centrifugación a 160 000 x g por 18 horas a 10 °C, para obtener una gradiente de densidad cloruro de Cesio (CICs). De esta centrifugación, se obtuvo una banda más nítida que correspondió a la densidad descrita anteriormente por Chen y Ramig (1992) para la cepa viral utilizada. Después de completar la fracción seleccionada con TBS a un volumen final de 1mL, esta fue dializada contra 200 ml de buffer TBS a 4°C durante 12 horas con cambios de buffer de diálisis cada 3 horas, y posteriormente alicuotazas y guardadas a -70°C hasta su uso en Transcripciones *in vitro*. La muestra dializada fueron analizadas en geles de poliacrilamida- Tris Glicina- SDS (Laemmli, 1970), determinándose la presencia de las proteínas virales VP6, VP3, VP2 y VP1. La concentración final se obtuvo por el método de Bradford (Bradford, 1976).

Para preparar core virales abiertos, se utilizaron las muestras de simple cubierta a las cuales se les completo el volumen a 1.5 ml con buffer TBS y se le añadió igual volumen de CaCl₂ 2M (libre de nucleasas). La mezcla fue incubada a 37°C durante 1 hora, agitándola cada 10 minutos. Posteriormente, la mezcla fue

centrifugada a 18 000 x g durante 10 minutos a 4°C para obtener un pellet conteniendo los cores virales. El sobrenadante es desechado y el precipitado fue lavado con 1ml de CaCl_2 1M y resuspendido en 1 ml de buffer LSB. Se tomó esta resuspensión y se dializó contra 200ml de TBS conteniendo CaCl_2 1M por 3 a 4 horas a 4 °C con agitación suave y luego se centrifugo a 18 000 x g por 10 minutos y el pellet se resuspendió en 400 μL de LSB y se dializó contra 200 ml de LSB por 24 horas a 4 °C, cambiándole el medio LSB 3 -4 veces. La solución obtenida fue identificada y guardada a menos de 4 °C, hasta su uso.

3.7. Síntesis *in vitro* y purificación de mRNAs totales de rotavirus.

Subpartículas de simple cubierta (40 μg) fueron incubadas en 500 μl de una mezcla de reacción conteniendo 120 mM Tris-HCl (pH 8.5), 1 mM MgCl_2 , 40 mM NaCl, 0.1 mM S-adenosilmetionina y 0.2 mM de cada nucleótido ATP, CTP, GTP y UTP. La mezcla se incubó por 2 horas a 45 °C y luego se ultracentrifugó a 160 000 x g por 2 horas a 4°C, recolectándose el sobrenadante, al cual se le realizó una extracción con fenol y se precipitó con 2.5 volúmenes de etanol frío con 1/10 volumen de acetato de sodio (NaCOOH) 3M pH 5.2 por 12 horas a -70 °C para precipitar los mRNA virales. La mezcla fue centrifugada a 13500 rpm por 30 minutos a 4 °C y el sobrenadante fue descartado. El precipitado se lavó en etanol 75% para luego resuspenderlo en 900 μl de H_2O libre de nucleasas. Posteriormente la suspensión se precipitó con 2M LiCl durante 18 horas a 4°C. La mezcla de precipitación se centrifugó a 18 000 x g durante 45 minutos a 0°C. El precipitado se resuspendió en 100 μl de H_2O libre de nucleasas para ser re-precipitado en 200 mM NaCl y 10 volúmenes de etanol. Los mRNAs virales precipitados se lavaron con etanol al 75% y se resuspendieron en 100 μl de H_2O libre de nucleasas. Los mRNAs virales fueron conservados a -70°C y se analizó su integridad y pureza en geles de poliacrilamida 7% y urea 7.5M. La cuantificación se

realizó mediante la medición de absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro Biophotometer de Eppendorf.

3.8. Ensayo de replicación *in vitro*.

Los ensayos de replicación *in vitro* fueron similares al descrito por Chen y colaboradores (1994) con algunas modificaciones. La mezcla de reacción (20 μ l) contiene 55 mM de Tris-HCl pH 8.2, 12 mM $MgCl_2$, 2% polietilenglicol 6000, 10 U de RNAase Out (Gibco BRL), 60 μ M de ATP, CTP y GTP, 2.0 μ Ci [α - ^{32}P]UTP (3000 Ci/mmol) y 0.5 μ g de “open core” virales. La reacción se incubó durante 2 horas a 32°C y se detuvo con 10 μ l de buffer carga para proteínas 2X. Cuando se determinó el efecto de la inhibición de la neomicina B sobre la replicación, se le agregó concentraciones crecientes a la mezcla previa a la incubación. Del mismo modo se le agregó mRNA virales provenientes de una cepa viral con otro electroferotipo, así como tRNA cuando el objetivo del experimento lo requería.

3.9. Electroforesis y tinción de RNAs.

Para el estudio de los productos de replicación se utilizaron geles de poliacrilamida-Tris Glicina-SDS al 12% similares a los utilizados para el estudio de proteínas (Laemmli, 1970). Los mRNAs virales completos fueron analizados en geles de 7% poliacrilamida-7 M Urea-TBE y los mRNA subgenómicos en geles de 30% poliacrilamida 7M urea-TBE. Luego de la electroforesis, los RNAs se visualizaron a través de una tinción con plata específica para ácidos nucleicos (Herring y col., 1982).

3.10. Ensayos de inhibición de multiplicación viral *in vivo* por neomicina.

A un grupo de platos de cultivos individuales de 21cm² de área conteniendo células MA104 infectadas con rotavirus SA11-4Fa una MOI de 0.001 (200 UFP/ml) se les mantuvo con MEM conteniendo 0.3, 0.6, 1.5, 3.0 y 4.5 mM de neomicina B por 24 horas post adsorción viral y luego se les realizó la extracción de dsRNA viral.

Para determinar la acción de neomicina B sobre la adherencia y penetración, un grupo de células MA104 cultivadas en los platos de cultivo fueron tratadas con diversas concentraciones de neomicina B (0.3, 0.6, 1.5, 3.0 y 4.5 mM) por 24 horas previa a la infección viral, y luego fueron infectadas con rotavirus SA11-4F, para posteriormente separarlas en dos subgrupos: un subgrupo de estas células fueron mantenidas en medio MEM sin SFB con 0.3, 0.6, 1.5, 3.0 y 4.5 mM de neomicina B y el otro subgrupo fue mantenido con MEM sin SFB y sin neomicina B; ambas por 24 horas más, para luego realizarse la extracción de dsRNA viral. Los controles realizados incluyeron células sin infección viral mantenidas en medio MEM, células sin infección mantenidas en MEM con la mayor concentración de neomicina B (4.5 mM) y células infectadas mantenidas en MEM a los cuales también se les realizó el proceso para extraer dsRNA virales.

3.11. Ensayo de transcripción e Inhibición de transcripción *in vitro* por aminoglucósidos.

Se utilizó partículas virales de simple cubierta en 5 μ L de un medio buffer conteniendo tris-HCl 120 mM pH8.5; MgCl₂ 10mM; NaCl 80 mM; ATP, GTP y CTP 4mM; [³H]UTP 200cpm/pmol; 0.1mM S-adenosil metionina y bentonita 1:250 las cuales fueron incubadas por 60 minutos a 45°C. A la mezcla incubada se le agregó 200 μ L de DNA de espermio de salmón (1 ng/ml), 200 μ L de pirofosfato de sodio (0.2 M) y 1mL

de TCA (Tricloro acético) al 10% en agua (v/v) e incubar sobre hielo por 20 minutos, el material ácido insoluble obtenido es filtrado en discos de filtros los cuales son posteriormente colocados en viales plásticos conteniendo 3ml de líquido de centelleo (tolueno conteniendo PPO 0.4% p/v. y POPOP 0.01% p/v) y leído en un espectrofotómetro de centelleo líquido.

Se realizó también ensayos de transcripción *in vitro*, utilizando la misma mezcla anterior, pero se reemplazó el [^3H]UTP por el [$\alpha\text{-}^{32}\text{P}$]UTP 100 μCi y luego de incubarse a distintos tiempos (10, 20, 40, 60 minutos) según sea el caso, a la mezcla se le realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 7% ó 30% 7M urea y luego del secado del gel se realizó una autoradiografía y cuantificación de las bandas con phosphor imager GS-525, para observar la producción de mRNA ó RNA virales de pequeño tamaño respectivamente.

Para determinar la inhibición de la transcripción por acción de neomicina B, tobramicina, paromomicina, lividomicina y kanamicina se realizó las transcripciones *in vitro* según el método descrito arriba, con la modificación de incorporarle diversas concentraciones de estos aminoglucósidos (1 a 12 mM) en forma individual en la mezcla de transcripción previo a la incubación de 45°C.

12.- Protección de mRNA por acción de RNasa.

Se incubó 5 μL de mRNA total (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) radioactivo marcado con P^{32} con distintas concentraciones de neomicina B (desde 250 μM a 5 mM) a 20°C por 15 minutos; posteriormente la mezcla fue incubada con 5 μL de nucleasa micrococcal (0.3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) diluido en una solución tampón que contiene Tris-HCl pH 8.0 (10mM) y 0.9M NaCl por

30 minutos a 20°C y luego se procedió a realizar una electroforesis en gel de 7% poliacrilamida- 7M urea. El gel fue revelado por autoradiografía.

En los experimentos para determinar protección de segmentos subgenómicos de mRNA asociado a subpartícula, se utilizó las subpartículas provenientes de una transcripción *in vitro* en presencia de [α -³²P]UTP (100 μ Ci) con una incubación de 10-20 minutos y aisladas por centrifugación (12 500 rpm por 10 minutos), estas subpartículas fueron resuspendidas en una solución tampón de transcripción y 5 μ L de esta mezcla (0.1 μ g/ μ L de subpartícula) fueron incubadas con 5 μ L de una suspensión de neomicina con concentraciones variadas desde 0.5mM a 5mM por 15 minutos a 20°C. Posteriormente, la mezcla de reacción fue incubada con una solución de nucleasa micrococcal (0.3 μ g/ μ L) por 15 minutos a 20 °C e inmediatamente, a la mezcla total se le realizó una electroforesis con gel de poliacrilamida 30%- 7M urea, revelándose el gel por autoradiografía (Ausubel y Col., 1994). Cuando fue necesario el uso de tRNA de levadura, esta se colocó a distintas concentraciones (0.25, 0.5, 1 y 2 μ g/ μ L) en la primera incubación junto con la subpartícula y la neomicina en una concentración determinada, para luego incubarlas con nucleasa micrococcal.

IV. RESULTADOS

4.1. Efecto de la neomicina sobre la multiplicación viral.

Para determinar si la neomicina producía inhibición sobre la multiplicación de rotavirus en células MA104, se realizó un ensayo de placas en presencia de concentraciones crecientes de neomicina B en el medio semisólido por tres días. Se observó que a concentraciones crecientes de neomicina B disminuyeron las UFP en forma dependiente de la concentración de neomicina B en el medio de cultivo; así a 1.5 mM disminuyó en un 15% las UFP y a 4.5mM hubo una disminución de 90-95% de las UFP. Las escasas UFP observadas en los cultivos con altas concentraciones de neomicina B, tuvieron un menor tamaño comparadas con las UFP del control viral (figura 1).

El control celular conteniendo 4.5 mM de neomicina B mostró la misma apariencia que el control celular. La ausencia de citotoxicidad a estas concentraciones, fue confirmada realizando una cuantificación de células vivas con tinción vital de azul de tripán al 0.25%, del total de células cultivadas con distintas concentraciones de neomicina B (0.075 a 7.5 mM), observándose una muerte celular de solo un 8% a una concentración de 4.5 mM a diferencia de la muerte celular del 85% obtenida con una concentración de 7.5 mM (Figura 2).

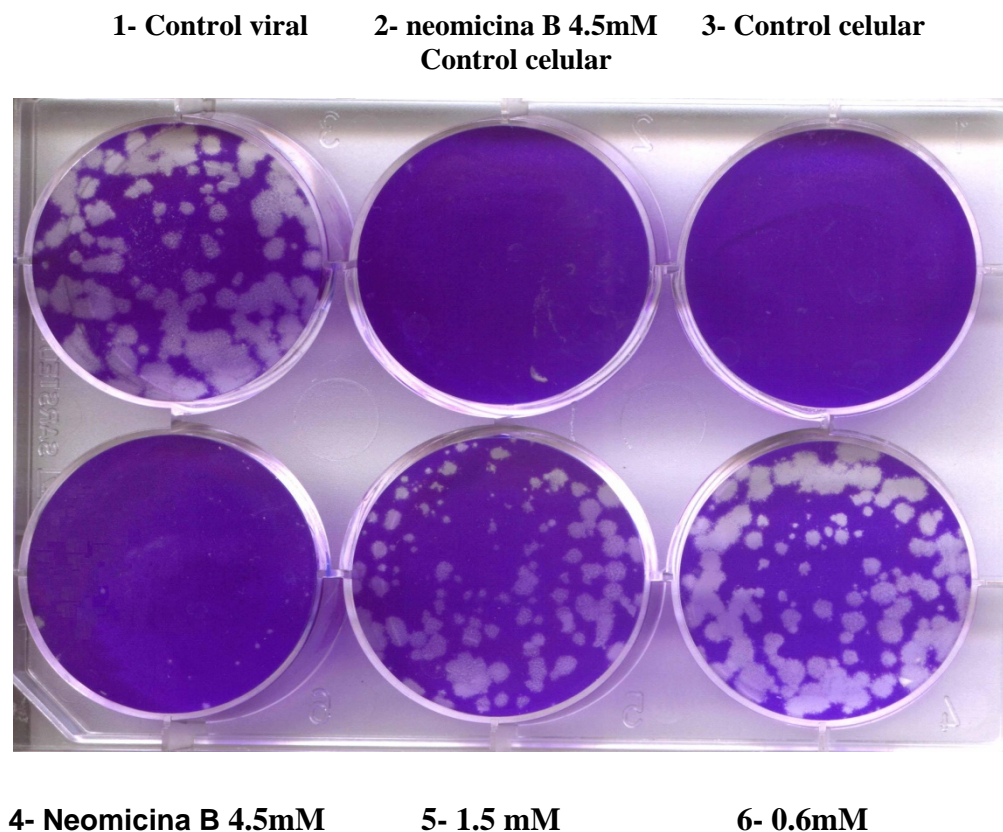


Figura 1. Efecto de distintas concentraciones de neomicina sobre la formación de unidades formadoras de placa (UFP) de rotavirus SA11-4F en células MA-104.- Monocapas celulares fueron infectadas con una M.O.I de 0.001 en presencia de 0.6 mM (pocillo 6), 1.5 mM (pocillo 5) y 4.5 mM (pocillo 4) de neomicina B en el medio semisólido conteniendo 0.5% de agarosa, incubadas por 72 horas a 37°C. Se observan el control celular (pocillo 3) y control celular con 4.5mM de neomicina B (pocillo 2).

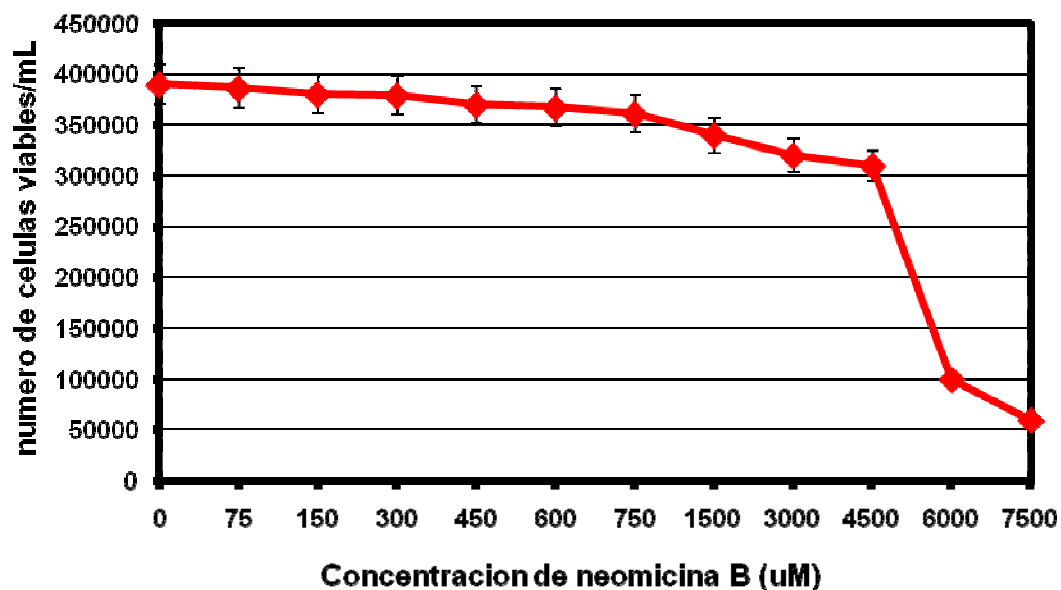


Figura 2. Efecto citotóxico de neomicina B en células MA 104.- Las monocapas celulares fueron incubadas por 48 horas a 37°C a diversas concentraciones de neomicina B y posteriormente fueron separadas con tripsina (0,125 %), y teñidas con azul de tripán al 0.25% por 10 minutos y luego se procedió a contar las células viables con un hemocitómetro tipo cámara de Neabauer.

4.2. Inhibición de la replicación viral en vivo por neomicina B.

Para encontrar una explicación al efecto de la neomicina B sobre la multiplicación viral, se procedió a analizar la producción de genoma viral en células infectadas con la cepa SA11-4F cultivadas conteniendo concentraciones entre 0.3 y 4.5 mM de neomicina en el MEM por 48 horas y luego de la extracción de RNA viral con el método de fenol-cloroformo, se le realizó una PAGE al 7% y revelado con coloración de plata. Como se observa en la figura 3, hubo una disminución de la síntesis de los 11 segmentos genómicos (dsRNA) rotavirales de una manera dependiente de la concentración de neomicina B (carriles de 1 al 5), no observándose síntesis a una concentración de 4.5 mM.

Para determinar si la falta de síntesis de dsRNA viral se debía a que la neomicina B impedía la penetración del virus a la célula, como ocurre en los herpesvirus (Langeland y col., 1987), las células MA104 fueron tratadas con distintas concentraciones de neomicina B (entre 0.3 y 4.5 mM) disueltas en el MEM por 24 horas y luego se les infectó con rotavirus con una M.O.I de 0.001 (200 UFP/ml). A un grupo de éstas células, se le mantuvo la misma concentración de neomicina B en el medio, mientras que al otro grupo se les retiró el medio con neomicina y se les añadió solo MEM, siendo incubadas a 37°C por 24 horas. En la figura 3, al análisis de PAGE, se observó la presencia de los 11 segmentos genómicos virales de dsRNA en todas las muestras del grupo de células tratadas (distintas concentraciones de neomicina B) y a las cuales no se les mantuvo la presencia de neomicina B post infección (carriles del 6 al 10); sin embargo, a las células tratadas e infectadas y mantenidas con neomicina B post infección, se observa que la presencia de los 11 segmentos de dsRNA viral sufre una marcada disminución, hasta desaparecer a 4.5mM (carriles del 11 al 15).

Para comprobar que la neomicina B afecta directamente la adsorción viral, se incubó en presencia de concentraciones crecientes de neomicina B (0.3 a 4.5mM), sólo durante la etapa de adsorción viral descrita en el método de infección de células. Luego de la incubación a 37°C por 48 horas, a las células se les realizó una extracción del RNA con fenol-cloroformo, los cuales fueron analizados por PAGE al 7%, observándose la presencia de todos los segmentos del genoma de rotavirus en las muestras de células infectadas, independiente de la concentración de neomicina B.

4.3. Efecto de la neomicina B en la replicación viral

Como el efecto inhibitorio la síntesis de dsRNA viral por la neomicina ocurre después de la adsorción viral, éste aminoglucosido actuaría sobre un evento del ciclo

viral posterior al ingreso del virus en la célula. Motivo por el cual se utilizó el sistema de replicación *in vitro*, para determinar si es ésta la fase viral la que es afectada por la neomicina B. El sistema de replicación endógeno *in vitro* permite observar los productos de la síntesis del dsRNA viral *de novo*, teniendo como templado el dsRNA presente en el open core, en condiciones adecuadas y en presencia de nucleótidos como se detalla en el método descrito. Como se observa en la figura 4, cuando se le agregó concentraciones crecientes de neomicina B (1, 5, 10, 25, 50, 75, 125 μ M) a la mezcla de reacción durante la replicación endógena *in vitro*, se observó que se produce una disminución en la síntesis de dsRNA, comparando con los productos de la reacción control (carril 1), en una forma dependiente de la concentración de neomicina B, hasta desaparecer casi por completo a una concentración de 125 μ M de neomicina B (carril 8). Esto fue confirmado con la cuantificación de los segmentos genómicos producidos, donde se le determinó el porcentaje de inhibición de la replicación endógeno (figura 4).

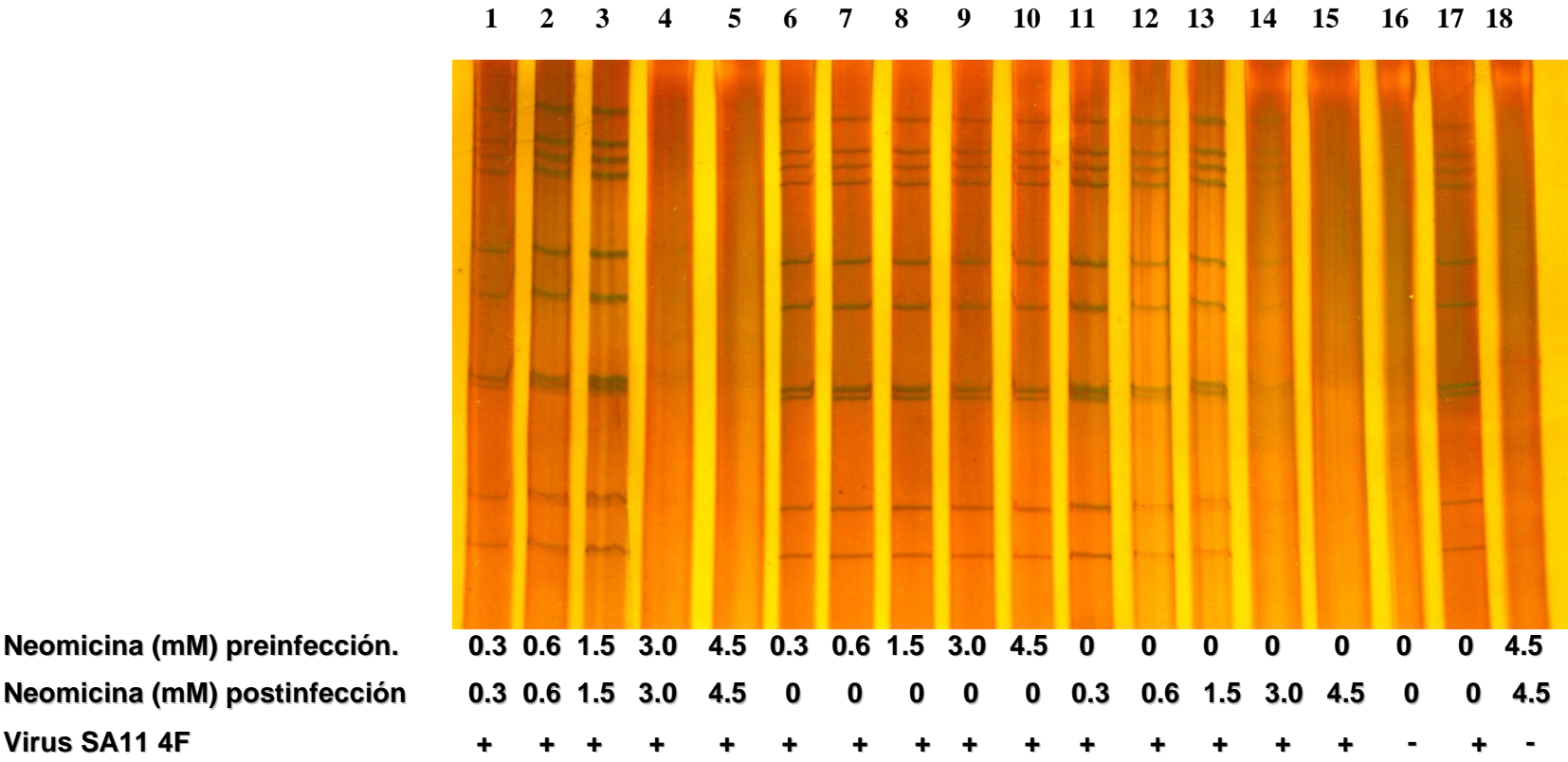


Figura 3. Efecto de neomicina B sobre la replicación del Rotavirus cepa SA11-4F en células MA104.- Electroforesis en gel de poliacrilamida al 7% revelada con tinción de plata mostrando los dsRNA virales. Se muestran las distintas concentraciones de neomicina utilizadas en el tratamiento pre infección de las células por 24 horas (carriles 1 a 10) y las concentraciones finales en el MEM post infección (carriles 1 a 5 y del 11 al 15). Se muestran también, los controles respectivos de células sin infectar (carril 16), células sin infectar con presencia de 4.5mM de neomicina B (carril 18) y células infectadas sin neomicina B (carril 17).

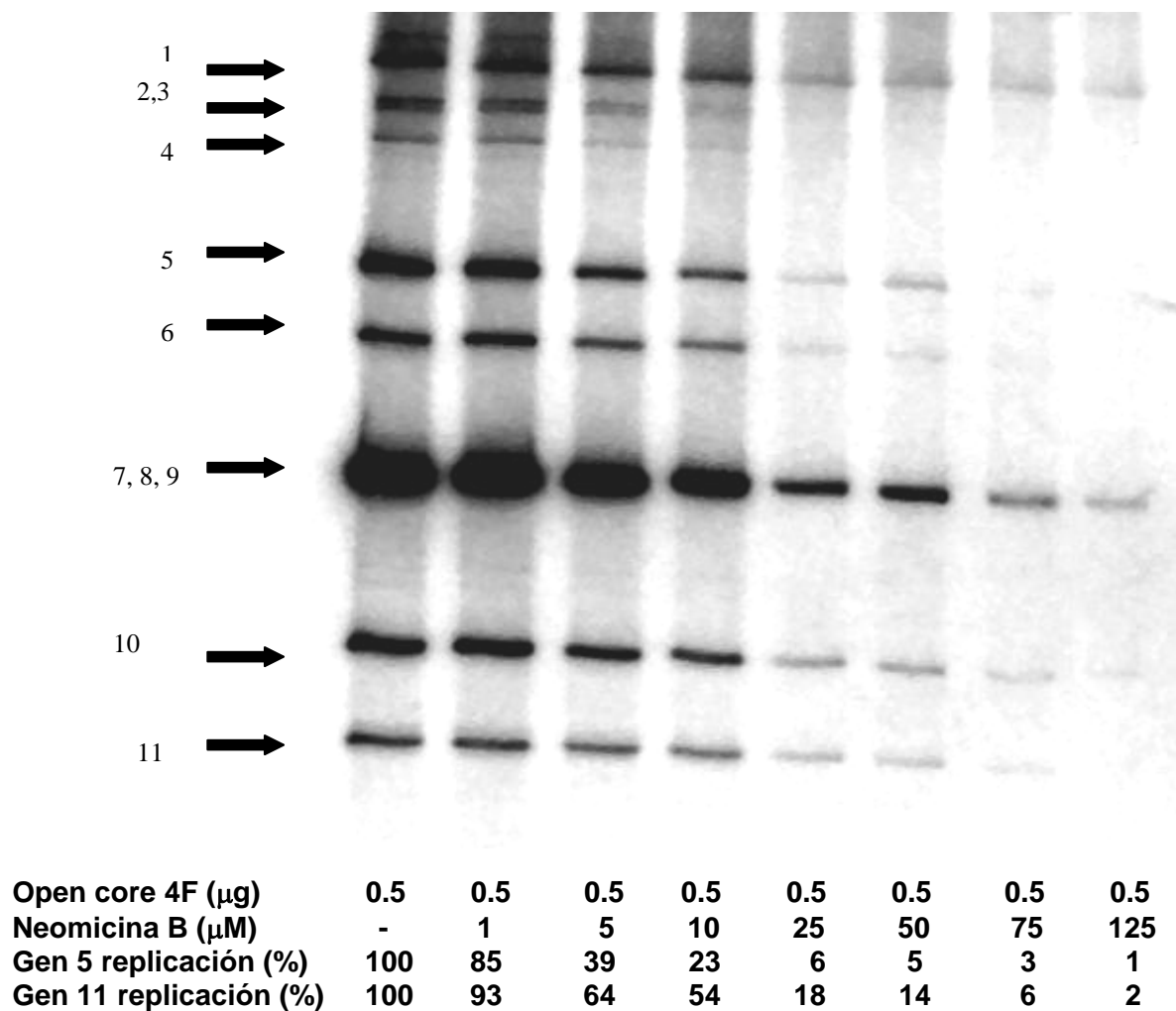


Figura 4. Efecto de neomicina B sobre la replicación de rotavirus. Autoradiografía de gel de poliacrilamida al 7% de los segmentos de dsRNA sintetizados por cores abiertos de la cepa SA11-4F, incubados en presencia de [α^{32} P]UTP y cantidades indicadas de neomicina B. El carril 1 corresponde al control en ausencia de neomicina B. La migración de los distintos segmentos son identificados por flechas. Los genes 5 y 11 fueron cuantificados mediante un analizador asignándoles su porcentaje de síntesis con respecto al control.

4.4. Efecto de la neomicina B sobre la síntesis de dsRNA de los diversos segmentos genómicos.

Como se observa en la figura 4, el grado de inhibición de la síntesis de dsRNA es distinto para los diversos segmentos genómicos a una determinada concentración de neomicina B. Un análisis cuantitativo de la intensidad de las bandas obtenidas de la imagen del gel de la replicación *in vitro* en presencia de distintas concentraciones de neomicina B, determinó una mayor susceptibilidad al efecto inhibitorio de la neomicina B a los segmentos 4, 2,3 y 6 respectivamente, Si bien es cierto, que también se observa una inhibición de los segmentos 7,8 y 9; no fue posible diferenciarlos independientemente porque éstos tienen una distancia de migración muy estrecha entre ellos y manifiestan en conjunto un alta cantidad de marca radioactiva en la autorradiografía y por ese motivo se les tomó en cuenta en forma grupal en la grafica de la tendencias de inhibición de los distintos segmentos genómicos (figura 5).

4.5. Efecto de la neomicina B sobre la síntesis de hebra negativa.

La replicación en rotavirus puede ser impedida por la falta de síntesis de mRNA que sirve de templado para la síntesis de la hebra negativa, ó por que no se sintetiza la hebra negativa sobre el templado para formar el dsRNA. Para determinar si la neomicina B afecta la síntesis de la hebra negativa, se utilizó el sistema de replicación exógeno *in vitro*, conteniendo distintas concentraciones de neomicina B. En este sistema se observan los productos de la síntesis de dsRNAs teniendo como templado los distintos mRNAs virales de la cepa DxRRV (1 µg) añadidos exógenamente al sistema de replicación *in vitro* con cores abiertos de la cepa SA11-4F incubados en condiciones adecuadas en presencia y ausencia de neomicina B. Los segmentos de dsRNA de la cepa DxRRV tienen un electroferotipo diferente a la cepa SA11. Como se observa en las figuras 6 y 7, al agregársele mRNA exógeno al sistema, se observa una

síntesis de dsRNA viral teniendo como templado los mRNA virales exógenos y una disminución en síntesis de dsRNA endógeno; sin embargo, también se observa una menor síntesis de los segmentos genómicos de mayor tamaño teniendo como templado al mRNA exógeno (carril 2). En presencia de neomicina B, se observó una disminución de síntesis de dsRNA que tuvieron como templado el mRNA exógeno, notándose que fue altamente susceptible y dependiente de la concentración de neomicina B; así a 50 μ M se observa una inhibición completa de todos los dsRNA formados desde el molde mRNA exógeno y un aumento de la síntesis dsRNA teniendo como templado el RNA endógeno de las partículas del open core, que se puede observar con mayor claridad por la expresión de los segmentos genómicos de mayor tamaño (carriles 5 y 6 de la figura 6).

En la figura 7, se observa que la neomicina B afecta tanto a la síntesis de dsRNA viral teniendo como molde al mRNA exógeno como al mRNA del endógeno, debido a que nunca se llega a tener una producción de dsRNA desde el endógeno similar a la obtenida en ausencia de neomicina B (comparación de carriles 6, 7, 8, 9 y 10 con el control del carril 1).

Para comprobar si el core abierto tiene la capacidad de sintetizar tanto la hebra positiva y la hebra negativa durante la síntesis de dsRNA, se realizó la replicación *in vitro* utilizando el 2'3' dialdehído adenosina 5' trifosfato un inhibidor de la transcripción (síntesis de la mRNA) *in vitro* de rotavirus (Pizarro y col., 1991) en presencia y ausencia de mRNA exógeno. Como se observa en la figura 8, el 2'3'dialdehído adenosina 5' trifosfato tuvo un efecto inhibitorio sobre la replicación *in vitro* a concentraciones de 3 - 4mM (carriles 2 y 6); sin embargo, en presencia de mRNA exógeno y 2'3' dialdehído adenosina 5' trifosfato en la mezcla de replicación, se formaba dsRNA de todos los segmentos genómicos en cantidades similares (carriles 4

y 5, 7 y 8) a los controles con presencia de mRNA exógeno (carril 3), lo que indicaba que el mayor efecto inhibitorio del 2'3' dialdehído adenosina 5' trifosfato fue sobre la síntesis de la hebra positiva (mRNA) y no afectaba la síntesis de la hebra negativa (figura 8).

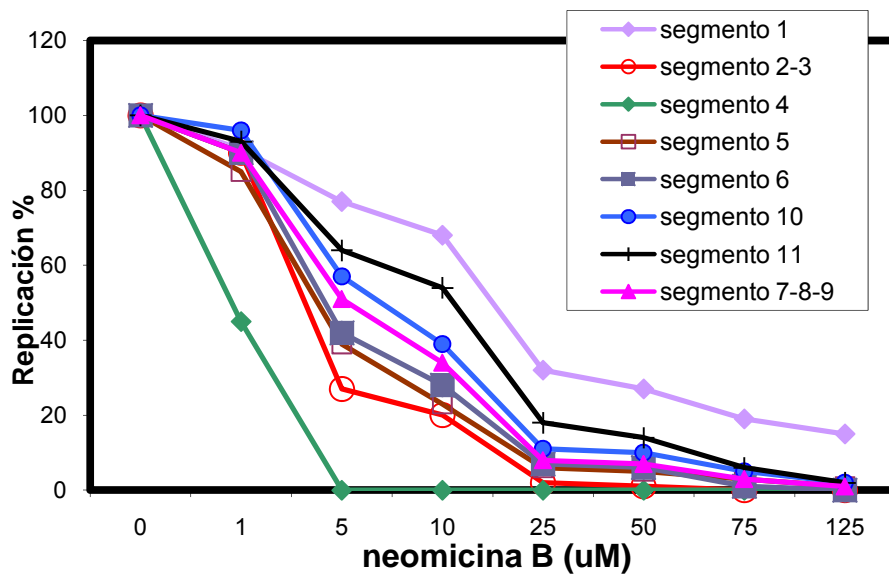


Figura 5. Efecto inhibitorio de la síntesis de los distintos segmentos genómicos de rotavirus por la neomicina B.- Los segmentos de dsRNA producidos de replications *in vitro* en presencia de distintas concentraciones de neomicina fueron cuantificados y graficados. El eje de las abscisas contiene el porcentaje (%) de replicación comparados con los segmentos producidos en el control en ausencia de neomicina. Cada valor del eje horizontal corresponde a las cantidades de neomicina B añadidas a cada ensayo.

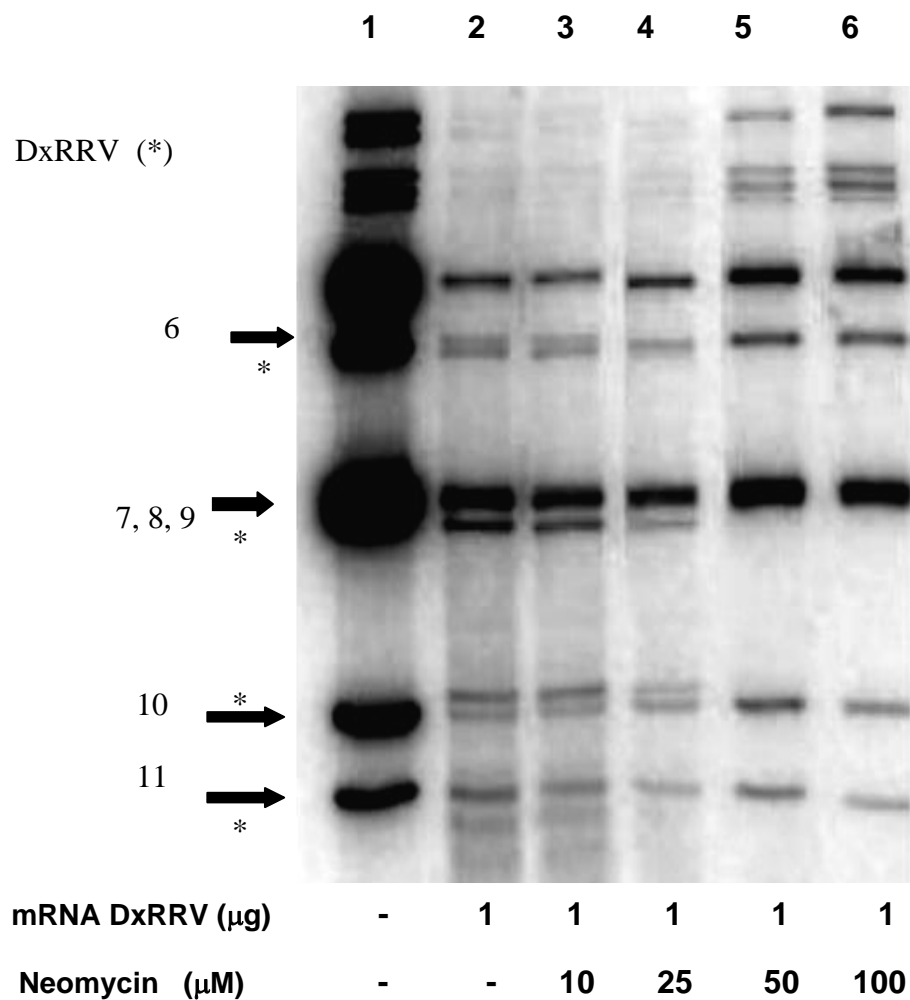


Figura 6. Efecto de la neomicina sobre la síntesis de la hebra negativa teniendo como templado el mRNA exógeno.- Autoradiografía de gel de 7% de poliacrilamida de los segmentos de dsRNA, sintetizados por 0.5μg de cores abiertos de la cepa SA11-4F incubados en presencia de [α^{32} P]UTP, 1μg de mRNA total de la cepa DxRRV y en cantidades crecientes de neomicina B, con las condiciones de una replicación *in vitro* detallada en métodos. El carril 1 muestra los productos de una replicación endógena (control). La migración de los distintos segmentos que expresan una mayor diferencia son indicados como (→) de la cepa SA11 y (*) de la cepa DxRRV.

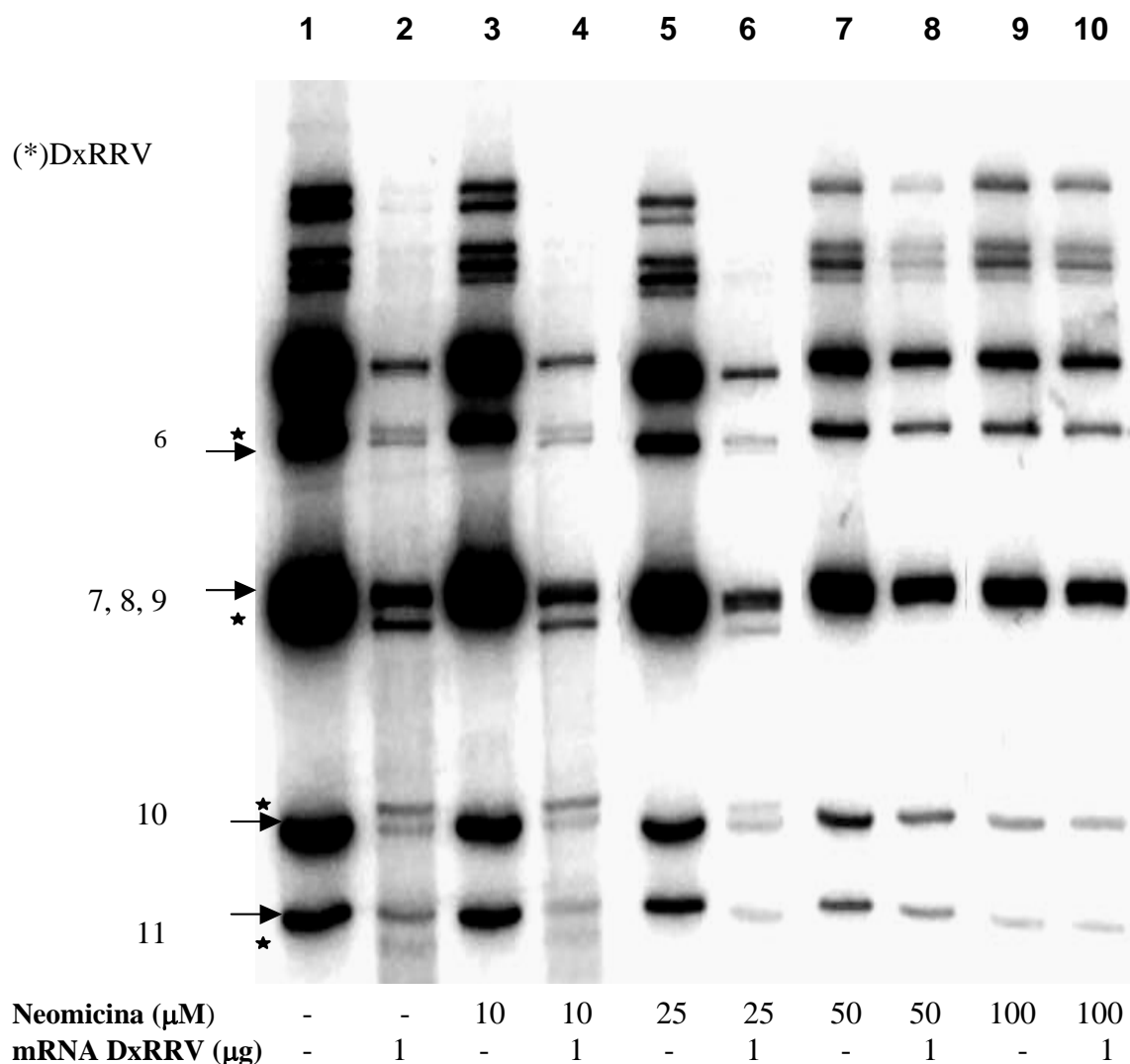


Figura 7. Síntesis de dsRNA en presencia y ausencia de mRNA y neomicina. Autoradiografía de gel de 7% de poliacrilamida de los segmentos de dsRNA, sintetizados por 0.5μg de cores abiertos de la cepa SA11-4F incubados en presencia de [α^{32} P]UTP, en presencia o ausencia de 1μg de mRNA total de la cepa DxRRV y en cantidades crecientes de neomicina B, con las condiciones de una replicación *in vitro* detallada en métodos. El carril 1 muestra los productos de una replicación endógena (control). Se identifican a los segmentos genómicos que expresan una mayor diferencia de migración electroforética entre las cepas SA11 (→) y DxRRV (*).

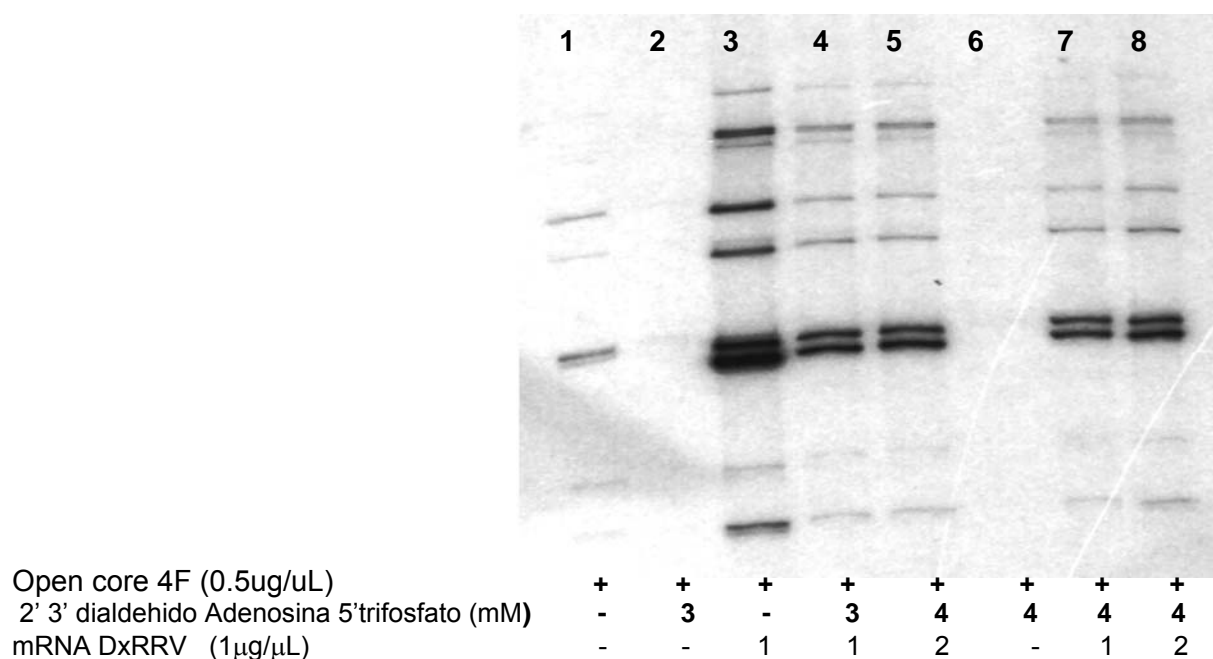


Figura 8 Síntesis de dsRNA teniendo como templado el mRNA exógeno en presencia del análogo de nucleótido 2',3' dialdehído adenosina 5'trifosfato (2',3'dialdehído ATP). Autorradiografía de un gel de poliacrilamida 7% de los segmentos de dsRNA sintetizados por cores abiertos de la cepa de rotavirus SA11-4F, incubados en presencia de [α^{32} -P]UTP, de 1 ug de mRNAs totales de la cepa DxRRV y las cantidades indicadas de 2',3' dialdehído ATP. El carril 1 muestra un control de síntesis de dsRNA viral y los carriles 2 y 6 muestran los efectos del 2',3' dialdehído ATP sobre la replicación.

4.6. La presencia de tRNA afecta la inhibición de neomicina en la síntesis de la hebra negativa.

Como la neomicina muestra una capacidad de inhibir la síntesis de la hebra negativa del rotavirus y se ha determinado que la neomicina se une a RNAs con estructuras secundaria tipo tallo orquilla, tallo con una burbuja interna provenientes de virus y de células eucariota incluyendo el tRNA (Faber y col., 2000; Kirk y Tor, 1999), ésta podría ser la forma de actuar del aminoglucósido sobre los mRNAs de rotavirus, debido a se predice muchos tipos de estructuras secundarias en el mRNA de rotavirus. Para determinar los grados de afinidad de la neomicina B por el tRNA y los mRNAs de rotavirus, se realizaron ensayos de replicación in vitro en presencia de 2 ug de tRNA y

distintas concentraciones de neomicina B en condiciones de competencia. Como se observa en la figura 9, la presencia de tRNA de levadura en la mezcla de reacción de la replicación *in vitro*, tiene un efecto inhibitorio en la síntesis de dsRNA viral (carril 2); pero cuando se le agrega las diferentes concentraciones de neomicina B, se produce un aumento de replicación de todos los segmentos genómicos virales, en forma dependiente de la concentración de neomicina B (carriles 5 y 6). Sin embargo, esta liberación de la inhibición del tRNA no es completa, sino que además, a una concentración mayor de neomicina (300 μM) se comienza a observar un efecto inhibitorio de la síntesis de dsRNA viral (carril 7) producido por la acción de la neomicina que también actúa como inhibidor de la replicación.

4.7. Protección de la neomicina B a distintas regiones del mRNA rotaviral de la acción de Nucleasa micrococal.

Para determinar si la neomicina interactúa directamente con el mRNA viral, se le realizó la prueba de protección de la acción de la RNasa micrococal por la neomicina B. El mRNA total de rotavirus radioactivo con ^{32}P se incubó con distintas concentraciones de neomicina B por 20 minutos a 20 °C, luego esta mezcla se incubó con RNasa micrococal por 20 minutos a 20 °C y a los productos obtenidos se les realizó PAGE con 30% poliacrilamida-8M urea. La figura 10, muestra una autoradiografía de un gel en donde se observó una completa degradación del mRNA (1.8 μg) por acción de la RNasa micrococal (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) (carril 6), pero en presencia de concentraciones crecientes de neomicina B se obtuvo una degradación parcial del mRNA con protección de diversas regiones del mRNA viral, observándose la presencia de bandas de diversos tamaños que representan a mRNA no degradados, que se hacen mas intensos al aumentar la concentración de neomicina en la reacción (carriles 1,2, 3, 4,5 y 7). Estas porciones de mRNA no son productos de la

degradación durante la producción del mRNA rotaviral, ya que como se observó en el control del mRNA no tratado con Rnasa no se observan las bandas de estos productos, sino un escaso mRNA degradado.

En la figura 10, también se observa que las muestras tratadas con Rnasa muestran un grupo de bandas de pequeño tamaño que están presentes en los controles no tratados con Rnasa. Para determinar si estas bandas corresponden a las regiones del mRNA naciente que se encuentran asociados y protegidos por la partícula de doble cubierta que se encuentran en el purificado de mRNA viral, se realizó un experimento donde las partículas virales purificadas después de una transcripción *in vitro* con una incubación corta de 10 minutos, fueron tratadas con nucleasa micrococcal para la posterior realización de un PAGE con 30% de poliacrilamida-8M urea para observar los segmentos de mRNA de pequeño tamaño. La figura 11 muestra a dos grupos de mRNA de diversos tamaños: un grupo de tamaños menores de no son afectados por la acción de la RNasa micrococcal, siendo protegidos posiblemente por la subpartícula viral hasta un tamaño aproximado de 35-40 bases y otro grupo de mayor tamaño que las anteriores que fueron sensibles a la acción de RNasa (carril 4). En presencia de la neomicina B muchos de los transcriptos fueron protegidos de la acción de la Rnasa micrococcal (carriles 5, 6, 7, y 8).

Tomando en consideración la acción del tRNA de levadura en la interacción de la neomicina con el mRNA, se incubó por 20 minutos los mRNAs totales viral radioactivos en presencia de distintas concentraciones de neomicina B y tRNA no radiomarcado, para luego incubarlos con RNasa micrococcal, en busca que la neomicina interactúe con el tRNA por su mayor afinidad demostrada en los experimentos anteriores y por lo tanto proteja menos al mRNA viral a la acción de la RNasa, pero contrario a lo que se esperaba, la figura 12 muestra una mayor intensidad

en las bandas de mayor tamaño protegidas cuando se expuso a la mezcla conteniendo diversas concentraciones de tRNA (0.25, 0.5, 1, 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y 250 μM de neomicina (carriles 6, 7, 8 y 9). La concentración de 250 μM de neomicina B fue la que mejor protegió al mRNA de la acción de RNasa (carril 4), pero a dosis bajas como de 25 μM también muestran un buen grado de protección (carril 1), por lo que a la concentración de neomicina B (250 μM) utilizada para interactuar con las distintas concentraciones de tRNA solo nos manifieste la propiedad de carrier de ácidos nucleicos que posee el tRNA y no su efecto competidor entre tRNA y mRNA para su interacción con la neomicina B.

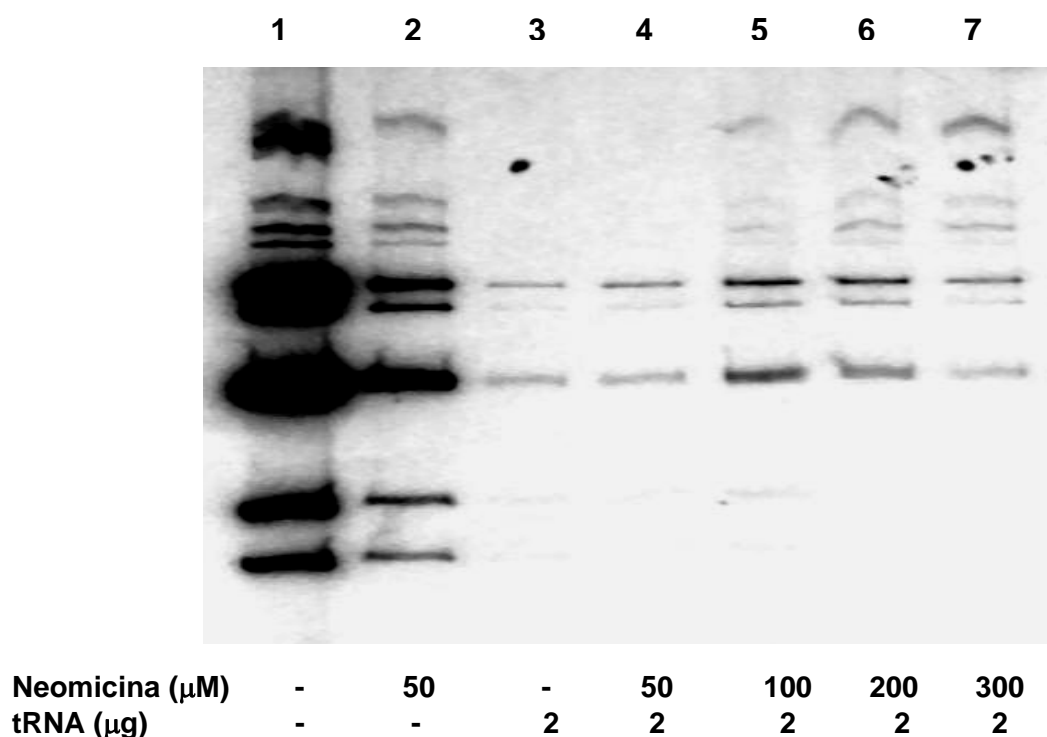
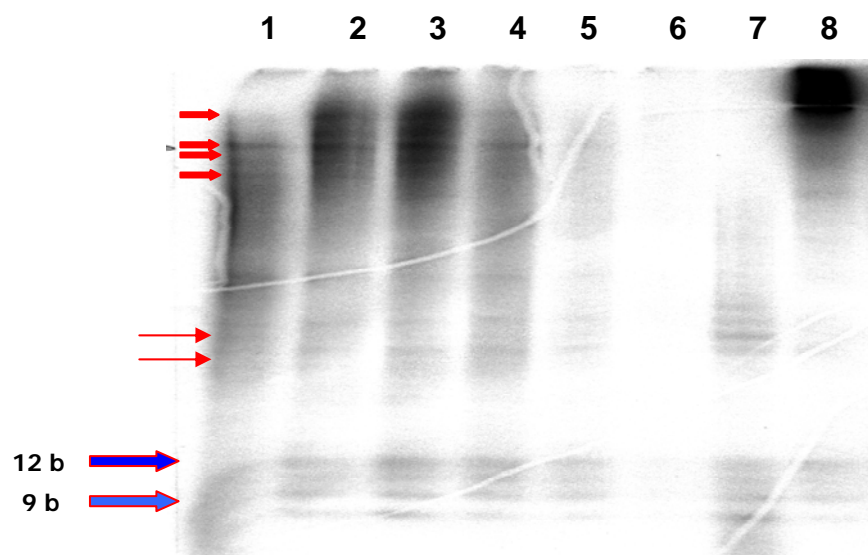


Figura 9. Efecto de neomicina B sobre la acción de tRNA de levadura en la replicación de rotavirus. Autorradiografía de un gel de poliacrilamida-7% de los productos sintetizados por 0.5 μg de cores abiertos de la cepa de rotavirus SA11-4F, incubados en presencia $[\alpha^{32}\text{-P}]\text{UTP}$ y cantidades indicadas de tRNA totales de levadura y neomicina B en condiciones de replicación *in vitro*. El carril 1 muestra los dsRNA producidos por una replicación en ausencia de neomicina B y tRNA de levadura (Control).



mRNA (μg)	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8
Rnasa micrococal 0.1ug/uL	+	+	+	+	+	+	+	-
Neomicina (mM)	0.25	0.5	1.5	2.5	0.15	-	0.05	-

Figura 10. Protección de neomicina B al mRNA rotaviral por acción de la RNasa micrococal.- Gel de poliacrilamida - 8M urea- TBE 7% de los productos de las reacciones de mRNA virales totales radioactivos incubados con neomicina B y nucleasa micrococal en las concentraciones indicadas, según el método descrito. Las flechas azules indican el tamaño de bases de oligonucleotidos usados como marcadores de peso moleculares y las flechas rojas los fragmentos de RNA que más se observan.

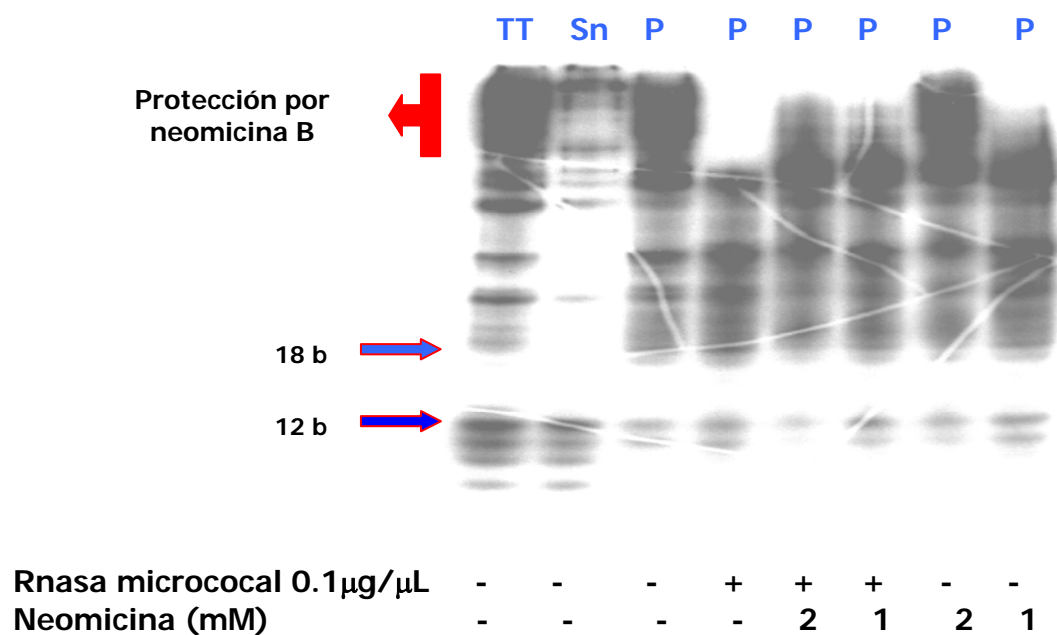


Figura 11. Protección de los transcritos subgenómicos asociados a subpartícula viral por la neomicina B, a la acción de la nucleasa micrococal.- Autorradiografía de un gel de poliacrilamida- 8M Urea-TBE 30%, de los productos de las reacciones de mRNA de pequeño tamaño incubados con neomicina B y con nucleasa micrococal, a concentraciones indicadas según lo descrito en el método de la prueba. Las flechas azules indican el tamaño molecular de los transcritos y las flecha roja indica el grupo de transcritos que

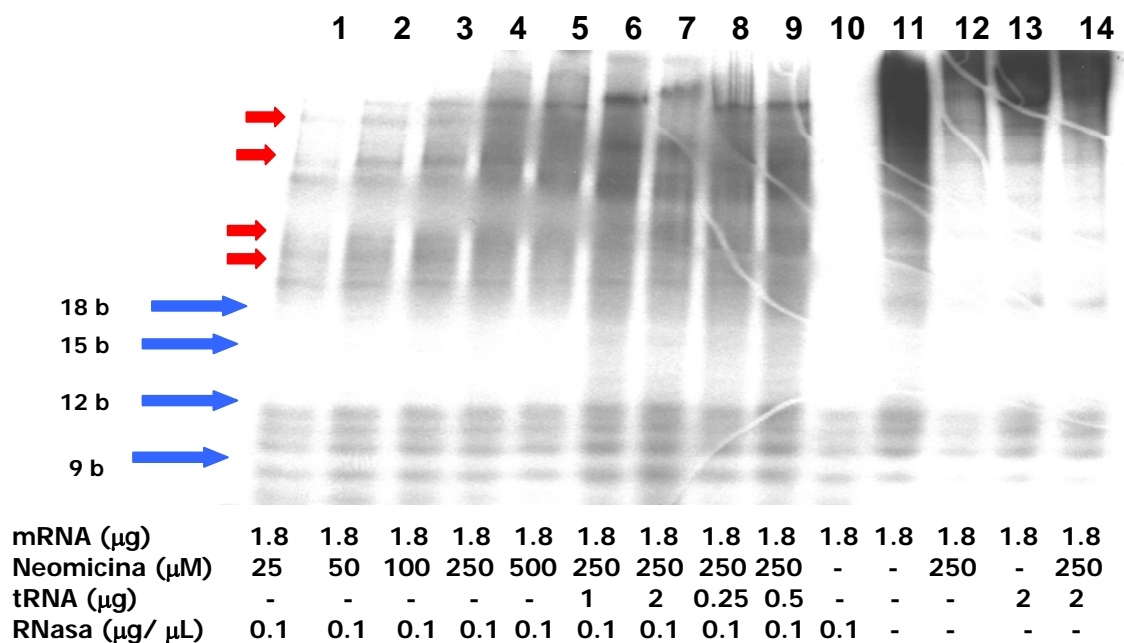


Figura 12. Protección del mRNA viral a la acción de la RNasa micrococal por la neomicina B en presencia de tRNA. Gel de poliacrilamida - 8M urea- TBE 7% de los productos obtenidos cuando los mRNA totales radioactivos, fueron incubados con neomicina B, RNasa micrococal y tRNA en las concentraciones indicadas; según el método descrito. Las flechas azules indican el tamaño de bases de oligonucleotidos usados como marcadores de peso moleculares y las flechas rojas los transcritos protegidos por la neomicina B.

4.8. Efecto de aminoglucósidos sobre la transcripción *in vitro* de rotavirus

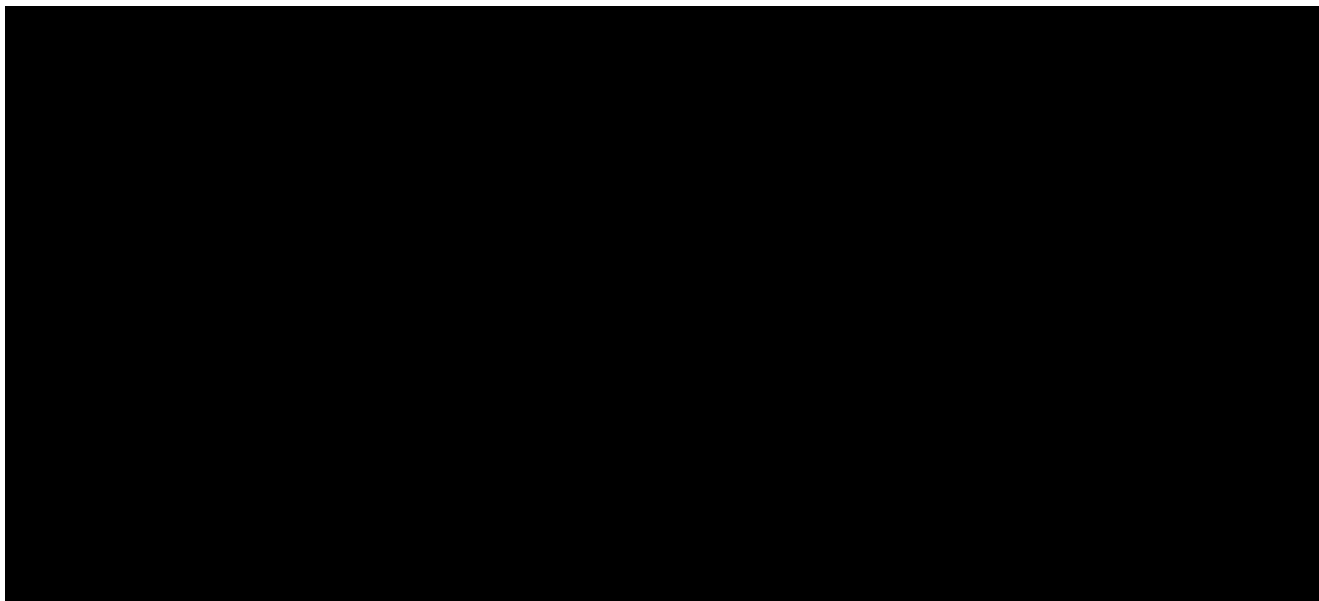
Para determinar si el efecto de la neomicina B sobre la replicación es de forma específica sobre la síntesis de la hebra negativa, se investigó su efecto sobre la transcripción del rotavirus, debido a que es necesaria la síntesis del mRNA que sirva de molde para la síntesis de su hebra complementaria y formar el dsRNA viral. Se utilizó el sistema de transcripción *in vitro*, al cual se le agregó distintas concentraciones de neomicina B, determinando su efecto inhibitorio, cuantificando la cantidad de pmol de ^3H -UMP incorporado en los productos ácido insolubles del ensayo. El mismo método fue empleado para medir la capacidad inhibitoria de otros aminoglucósidos como paromomicina, tobramicina, lividomicina y kanamicina. Los resultados indican que a excepción de la kanamicina, todos los demás aminoglucósidos estudiados muestran propiedades inhibitorias sobre la transcripción *in vitro* de rotavirus (figura 13). Igualmente, los aminoglucósidos muestran una tendencia similar de inhibición dependientes de su concentración, sin embargo, existe diferencia en su actividad inhibitoria de mayor a menor de neomicina>paramomicina>tobramicina>lividomicina.

Para confirmar que la neomicina inhibe la síntesis de los 11 tipos de mRNA, se empleó el método de transcripción *in vitro*, pero usando ^{32}P -UTP en la mezcla de nucleótidos para obtener mRNA radioactivos, los que fueron analizados por PAGE al 7% - 8M urea. Como se muestra en la figura 14, a mayor concentración de neomicina B existe una mayor inhibición de la síntesis de mRNA completos de todos los segmentos. También se observa que la susceptibilidad a la acción inhibitoria de la neomicina B es distinta para cada segmento (figura 14).

4.9. La neomicina no afecta el centro catalítico de la polimerasa viral

Debido a que la neomicina B puede actuar como un polication compitiendo con iones de magnesio para unirse en el núcleo catalítico de ribosimas produciendo la

inhibición de su actividad (Hermen y Westhof, 1998; Hoch y col., 1998); se investigó si el efecto de la inhibición de la transcripción de la neomicina era debido a su competencia con el ion magnesio, para unirse en el centro catalítico de la polimerasa. Para ello, se realizaron diversas transcripciones *in vitro* en presencia de una concentración inhibitoria de neomicina (4 mM), variando las concentraciones de cloruro de magnesio en la mezcla de reacción, para posteriormente medir los pmol de ³H-UMP incorporado en los mRNA producidos. Como se observa en la figura 15, el aumento de concentración de cloruro de magnesio en el medio de reacción no afectó la capacidad de la neomicina de inhibir la transcripción *in vitro*. Se debe tener en cuenta que una alta concentración de sales de magnesio afecta la eficiencia de la transcriptasa como se observa en la figura 15 con la producción de transcriptos por la polimerasa viral en ausencia de neomicina B (control).



B

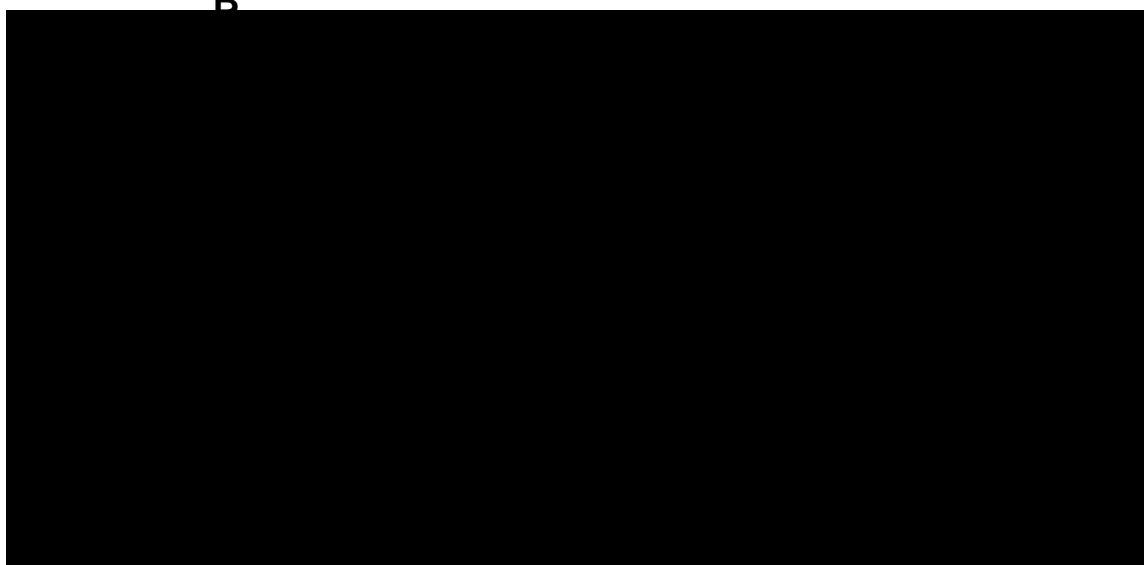


Figura 13.- Efecto de aminoglucósidos sobre la transcripción *in vitro* de rotavirus SA11-4f. Panel A. Se cuantificaron los transcriptos radioactivos producidos durante una transcripción *in vitro* en presencia de distintas concentraciones de neomicina, teniendo como un 100% a los productos de la transcripción *in vitro* en ausencia de neomicina B.

Panel B. Cantidad de pmol de ^3H -UMP incorporado en los productos ácido insolubles de una transcripción *in vitro* en presencia de subpartículas de rotavirus, ^3H -UTP y distintas concentraciones de los diversos aminoglucosidos detallados en la leyenda de la gráfica.

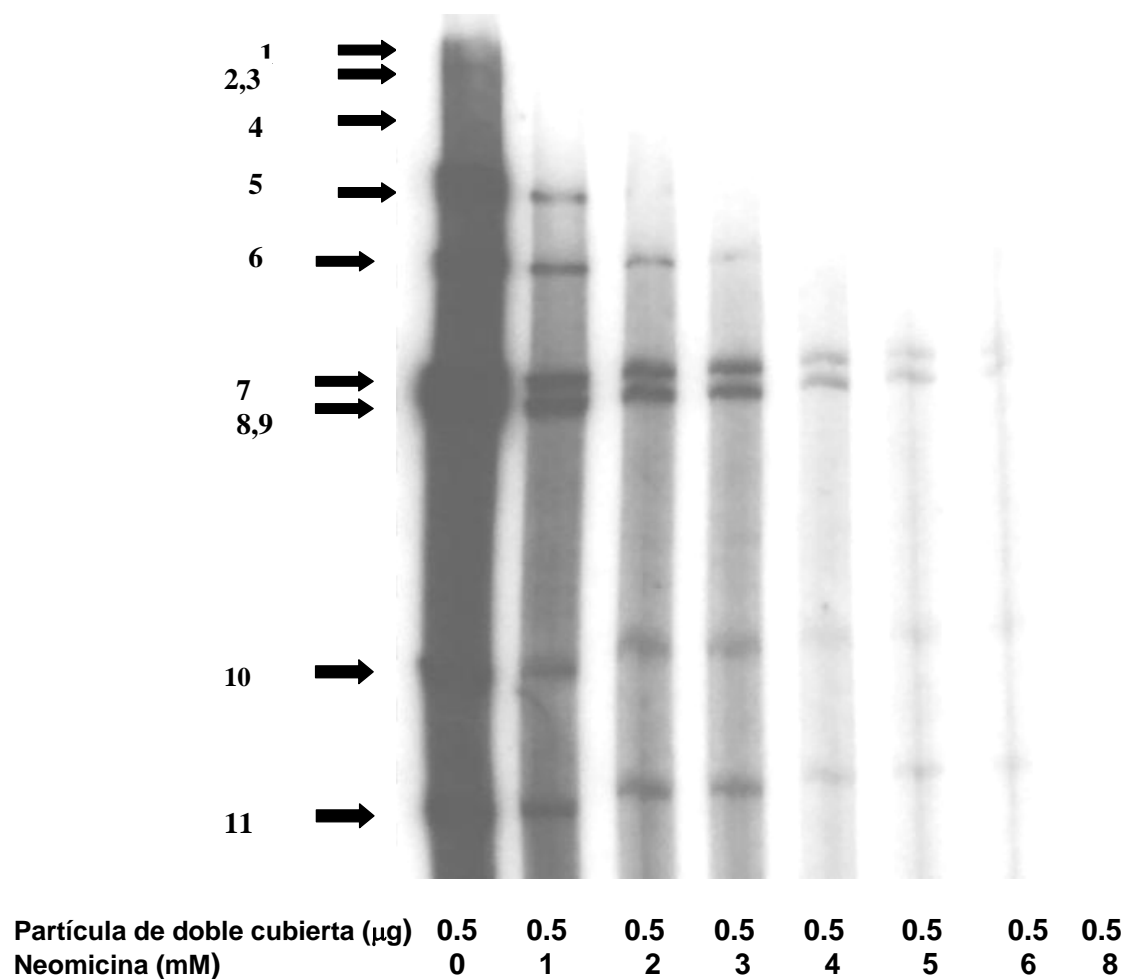


Figura 14. Efecto de la neomicina B sobre la transcripción *in vitro* de rotavirus.- Autorradiografía de un gel de poliacrilamida-8 M urea – TBE 7% donde fueron analizados los productos de las reacciones en las que subpartículas provenientes de la cepa de rotavirus SA11-4F fueron incubados en condiciones indicadas para la transcripción *in vitro*, en presencia de [α^{32} -P]UTP y en presencia de neomicina. Los mRNA de cada segmento genómico están identificados con flechas y número respectivo

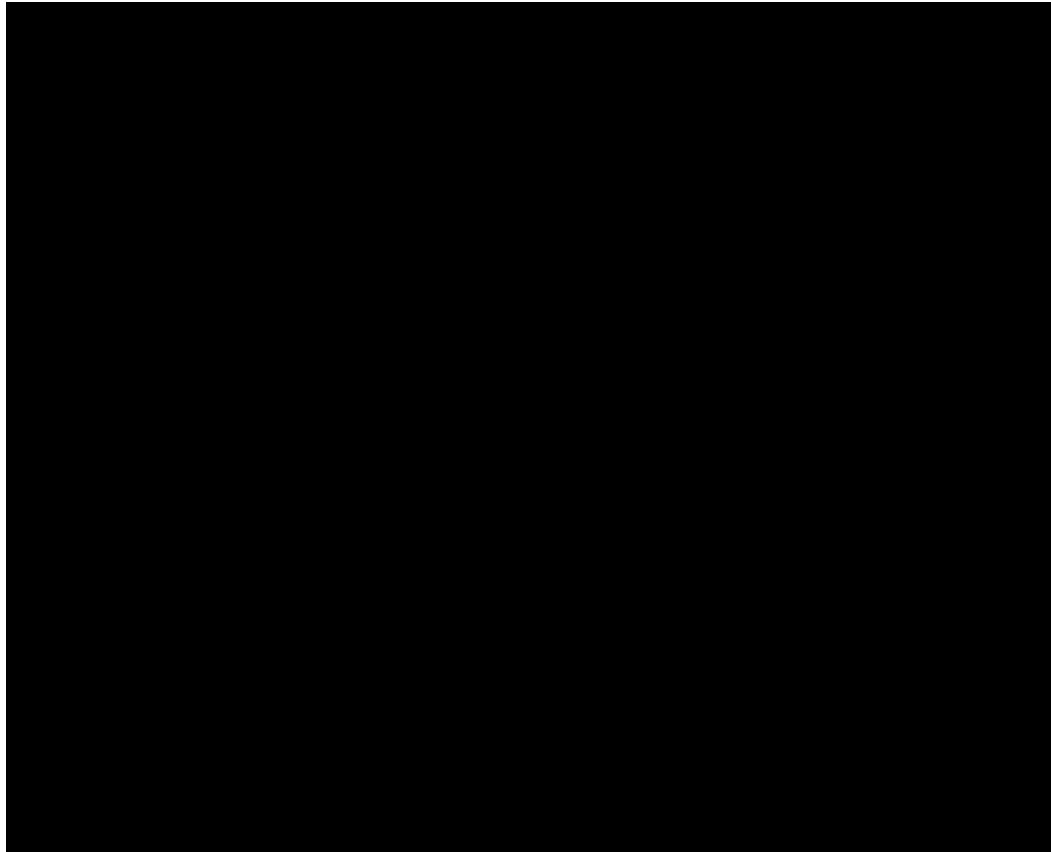


Figura 15. Transcripción *in vitro* de Rotavirus SA11 en presencia de neomicina B y distintas concentraciones de Cloruro de Magnesio. Cantidad de ^3H -UMP incorporado en los productos de transcripciones *in vitro* utilizando una mezcla de transcripción con concentraciones de cloruro de magnesio (eje de ordenadas) y la presencia de 4 mM de neomicina B. Los productos radioactivos fueron precipitados en medio ácido y aislados por filtración para su análisis.

4.10. Formación de transcritos subgenómicos virales durante la transcripción *in vitro* de rotavirus.

Cuando los productos de una transcripción *in vitro* fueron analizados en PAGE al 30% - 8M urea, se observó la presencia de transcritos pequeños de diversos tamaños, siendo los de mayor producción los transcritos de aproximadamente 6 a 9 bases (figura 16). Las condiciones de tiempo de incubación (1 a 30 minutos) y la temperatura (37 y 45 °C) utilizadas en las transcripciones *in vitro* no afectaron la producción de los transcritos pequeños (figura 16). La producción de estos transcritos pequeños o subgenómicos indican la posible existencia de eventos de pausas en el inicio de la transcripción en rotavirus.

Para determinar si estos mRNA subgenómicos, están asociados a las partículas de doble cubierta, las partículas virales aisladas luego de 10 minutos de transcripción *in vitro*, fueron procesadas para la extracción de su RNA por el método de extracción de fenol-cloroformo y se realizó una PAGE al 30% – 8M urea. Se observaron la presencia de los mRNA subgenómicos tanto en los productos de la mezcla total de transcripción, así como en la extracción procedente solamente de las subpartículas aisladas por centrifugación (figura 17), determinando que los mRNA subgenómicos de pequeños tamaños estaban asociados a la partícula viral.

Para determinar si estos mRNA subgenómicos eran precursores de un mRNA completo o transcritos abortivos del proceso de transcripción, se realizó una prueba de pulso y caza de los transcritos subgenómicos. Para esto, se realizó una transcripción *in vitro* de 10 minutos en presencia de $\alpha^{32}\text{P}$ -UTP y se aislaron las subpartículas que fueron utilizadas en una segunda transcripción *in vitro* en ausencia de marca radiactiva a distintos tiempos de incubación y en presencia y ausencia de nucleótidos en la mezcla de reacción. Posteriormente, se realizó PAGE al 7 y 30 % -8M urea,

simultáneamente a todas las muestras. En los geles al 30% de poliacrilamida, de los productos de la segunda transcripción en presencia de nucleótidos, se observó que los transcriptos subgenómicos radioactivos asociados a subpartícula disminuyeron grandemente y aumentó en forma intensa una ancha banda en la parte superior de los carriles correspondiente a mRNA virales de gran tamaño; mientras que en los productos de la segunda transcripción en ausencia de nucleótido, los transcriptos subgenómicos se mantienen inalterables (figura 18 A) .

Los resultados del gel al 7%, en donde se observa la presencia de los 11 mRNA completos del rotavirus solamente en las muestras que fueron incubadas con nucleotidos no radioactivos en la segunda transcripción *in vitro* (Figura 18 B) confirmaron que los transcriptos subgenómicos fueron precursores de los mRNA completos.

4.11. La neomicina B y otros aminoglucósidos afectan el inicio de la transcripción.

Para comprobar que la neomicina inhibe el inicio de la transcripción formando algún transcrito abortivo, se realizaron transcripciones *in vitro* usando ^{32}P - UTP y cantidades crecientes de neomicina B en la mezcla de reacción, y sus productos fueron analizados por PAGE al 30% - 8M urea. Se observó una disminución general en la producción de los transcritos subgenómicos en forma dependiente a la concentración de neomicina B, con una ausencia casi completa de mRNA completos sobre todo a 12 mM (Figura 19). La cuantificación de los transcritos subgenomicos producidos, mostraron distintos grados de sensibilidad a la neomicina B (Figura 20). Este resultado indicó que la neomicina B inhibe los primeros eventos de la transcripción afectando el inicio de la síntesis de transcriptos.

Cuando se realizó el mismo experimento con otros aminoglucósidos, como la tobramicina, paramomicina y lividomicina, los resultados fueron similares a los obtenidos con la neomicina B, afectando la transcripción desde el inicio de la formación de los transcriptos virales (Figura 21); sin embargo, la actividad inhibitoria de la transcripción fue distinta para los diferentes aminoglucósidos, siendo de mayor a menor: neomicina > tobramicina > paramomicina > lividomicina, y las cuantificaciones de síntesis de transcriptos subgenómicos en presencia de distintas concentraciones de los aminoglucósidos, utilizando unidades arbitrarias (cuentas radioactivas) corroboran esta afirmación (Figura 22).

4.12. Neomicina afecta la elongación de los transcriptos subgenómicos.

Para determinar si la neomicina también puede inhibir la elongación de los transcriptos subgenómicos, a las partículas aisladas por centrifugación luego de un evento de transcripción *in vitro* teniendo como componente de la mezcla de reacción ³²P-UTP, se les utilizó en un segundo evento de transcripción *in vitro* en presencia de nucleótidos no marcados, a distintos tiempos de incubación (20, 40, 60 minutos) y con la presencia y ausencia de 4mM neomicina en la mezcla de reacción. En el gel de 7% de poliacrilamida- 8M urea, se observó que en ausencia de neomicina se observan la síntesis de los 11 mRNA completos en todos los tiempos; lo que indicó que los transcriptos subgenómicos fueron elongados completamente, a diferencia de lo observado en presencia de neomicina B en donde se observa una ausencia de los 11 segmentos en todos los tiempos utilizados (figura 23).

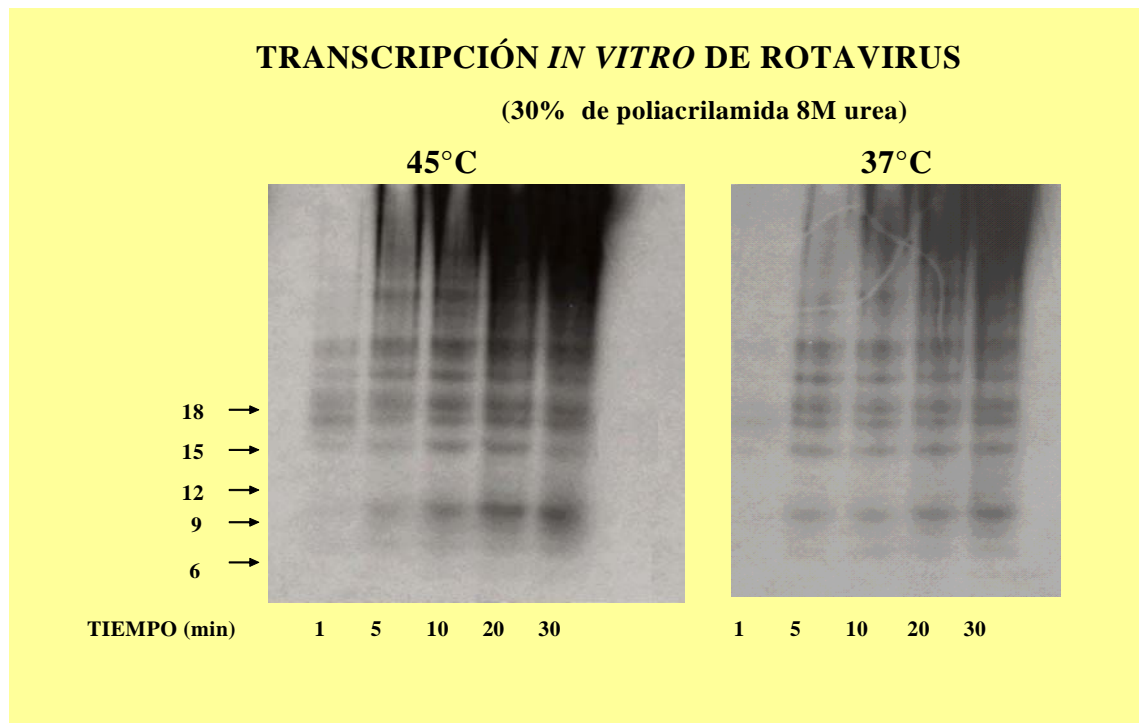


Figura 16. Formación de transcriptos pequeños en durante la Transcripción *in vitro*. Autorradiografía de poliacrilamida- 8M urea - TBE 30% de los productos de las transcripciones *in vitro*, utilizando subpartículas de la cepa SA11-4F, incubadas en condiciones indicadas (Panel A a 45°C y Panel B a 37°C) en presencia de [α^{32} P]UTP. Se indican los pesos moleculares con flechas y numero de bases en el lado izquierdo de la figura.

Tt P E

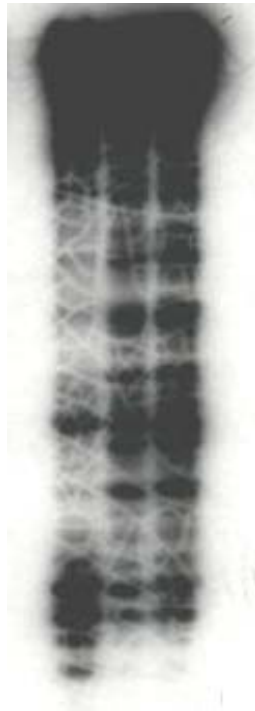


Figura 17. Los transcritos de tamaño pequeño están asociados a la partícula. Autorradiografía de un gel de poliacrilamida – 8M urea – TBE 30%. de los productos obtenidos de la partícula aislada tratada con fenol después de la transcripción *in vitro*, en presencia de [$\alpha^{32}\text{P}$]UTP. Se señalan con Tt = productos totales de transcripción, P= partícula aislada y E= partícula tratada con fenol.

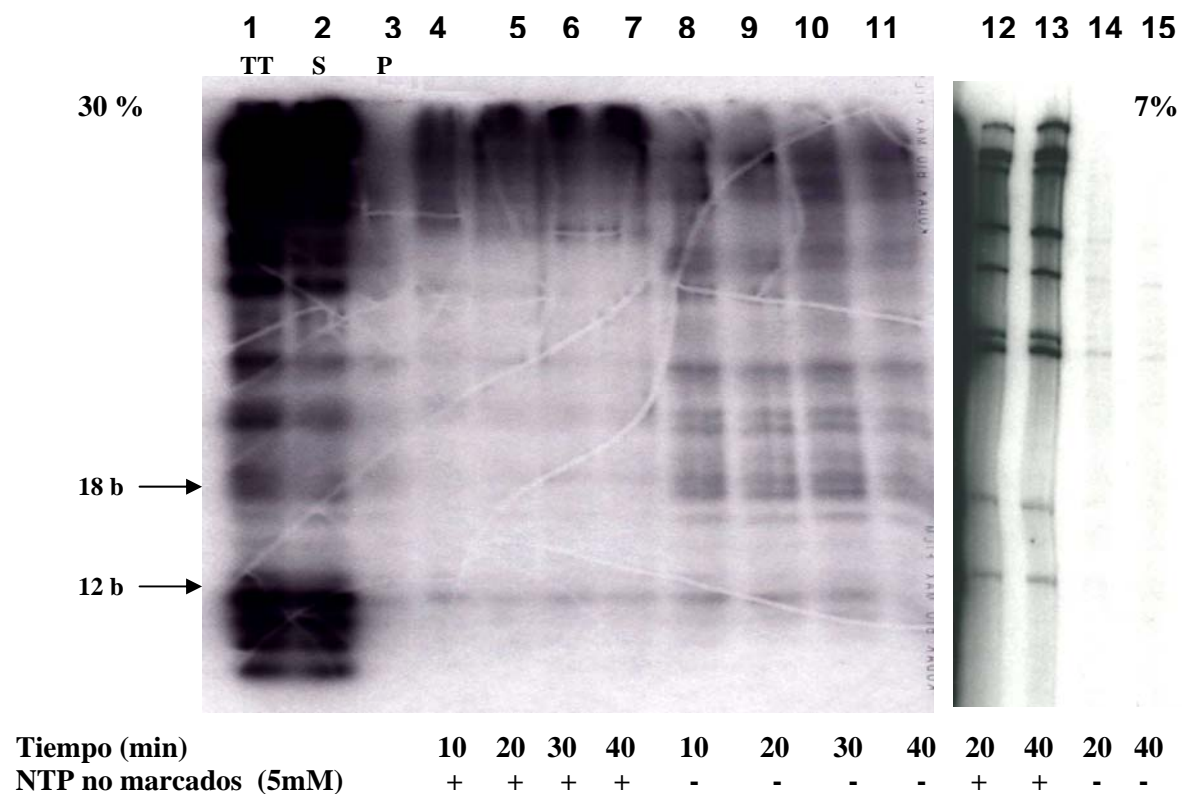


Figura 18. Transcritos subgenómicos son precursores de los mRNAs rotavirales.
Panel A.- Autorradiografía de gel de poliacrilamida - 8M urea - TBE 30% de los productos de las reacciones de transcripción *in vitro* utilizando subpartículas de doble cubierta de rotavirus SA11-4F, incubadas en condiciones indicadas, a diversos tiempos de incubación, en presencia (carriles 4 al 7) y ausencia de nucleótidos (carriles del 8 al 11). Las subpartículas virales utilizadas, fueron previamente aisladas de la mezcla de reacción final de una transcripción *in vitro* bajo las condiciones indicadas en métodos, en presencia de [α^{32} P]UTP.
Panel B.- Autorradiografía de un gel de poliacrilamida - 8M urea - TBE 7% de los productos de las reacciones de transcripción *in vitro*, empleados en los carriles 6 y 7 del gel de poliacrilamida - 8M urea - TBE 30% del panel A. Las flechas señalan los

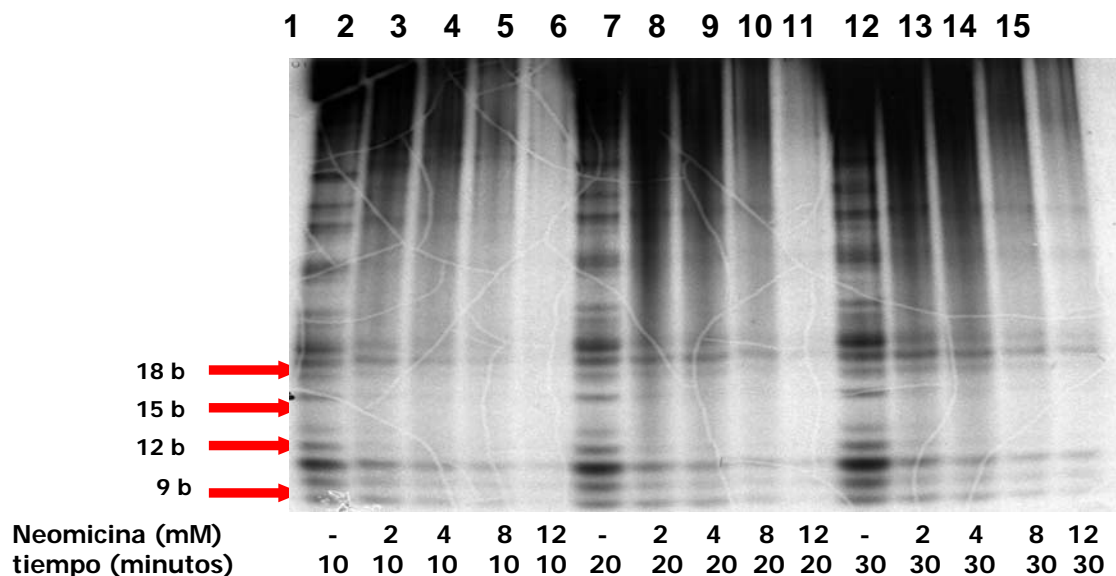


Figura 19. Efecto de la neomicina B sobre el inicio de transcripción. Autorradiografía de un gel de poliacrilamida-8 M urea-TBE 30% donde fueron analizados los productos de transcripciones *in vitro* utilizando subpartículas de la cepa SA11-4F, incubadas en presencia de [α^{32} -P]UTP y distintas concentraciones de neomicina B, bajo las condiciones indicadas en métodos. Los tamaños moleculares están identificados con flechas y número respectivo.

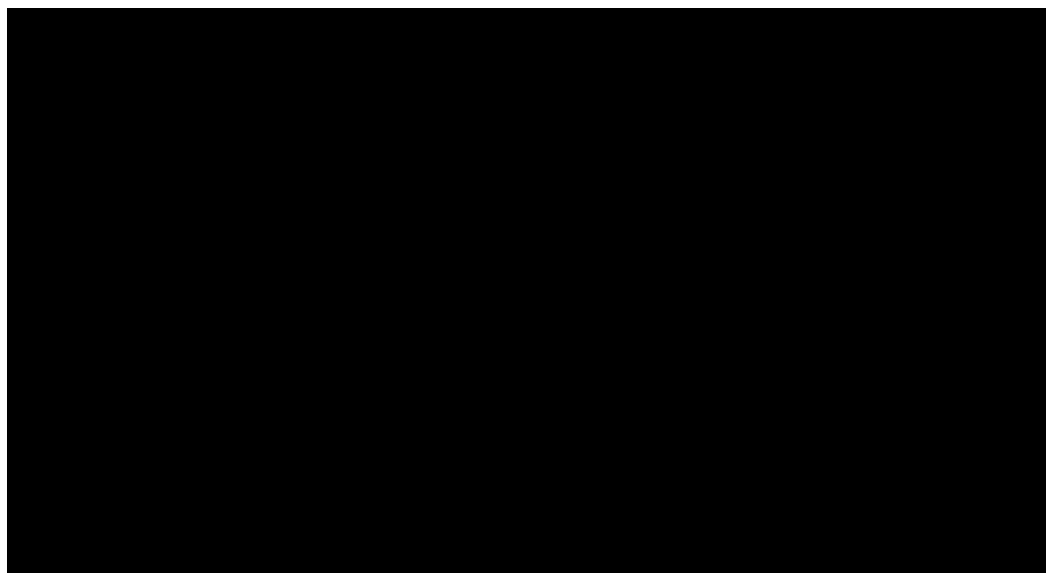


Figura 20. Efecto de diversas concentraciones de neomicina B sobre el inicio de la transcripción. Cuantificación de los productos subgenómicos de la transcripción *in vitro* con una incubación de 30 minutos, en presencia de diversas concentraciones de neomicina B (Figura 20). El eje de las ordenadas indican el tamaño aproximado de los transcritos (número de nucleótidos) y el eje de las abscisas el porcentaje de producción de cada transcrito con las distintas concentraciones de neomicina B (leyenda del gráfico), teniendo como un 100% de transcripción a la cantidad de transcritos producidos en una transcripción *in vitro* en ausencia de neomicina B.

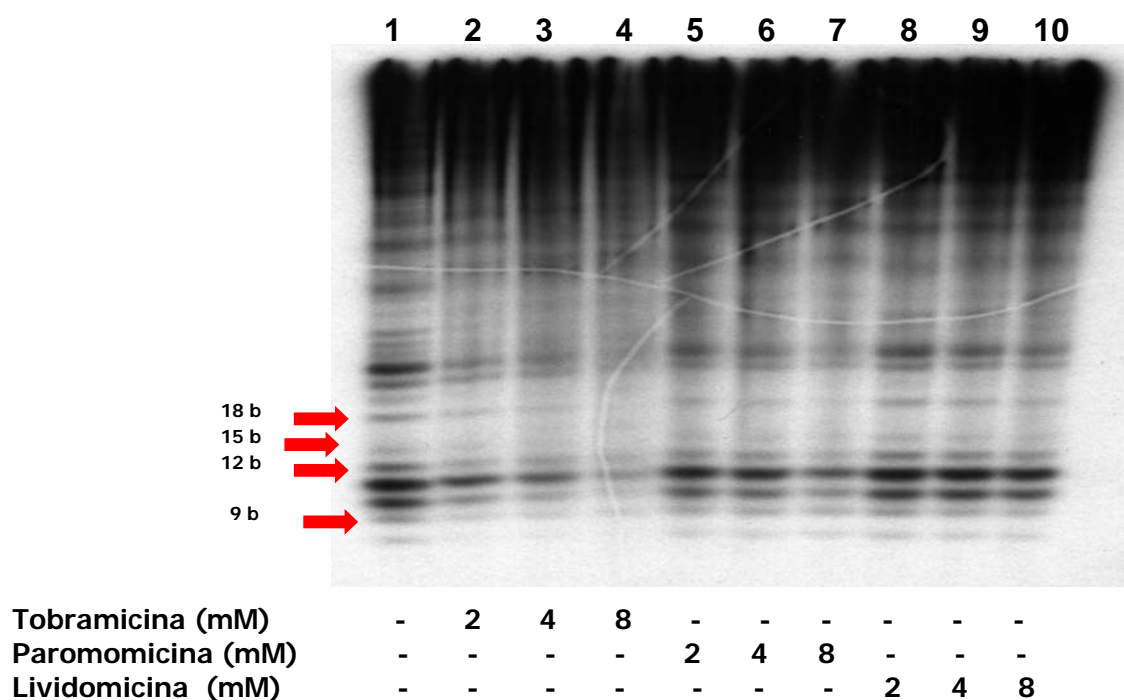


Figura 21. Efecto de los aminoglucosidos sobre el inicio de transcripción. Autorradiografía de un gel de poliacrilamida- 8 M urea – TBE 30% donde fueron analizados los productos de transcripciones *in vitro* utilizando subpartículas de la cepa SA11-4F, incubadas en presencia de [$\alpha^{32}\text{P}$]UTP y en presencia de distintas concentraciones de tobramicina, paromomicina y lividomicina en condiciones indicadas en métodos. Los tamaños moleculares están identificados con flechas y número respectivo.

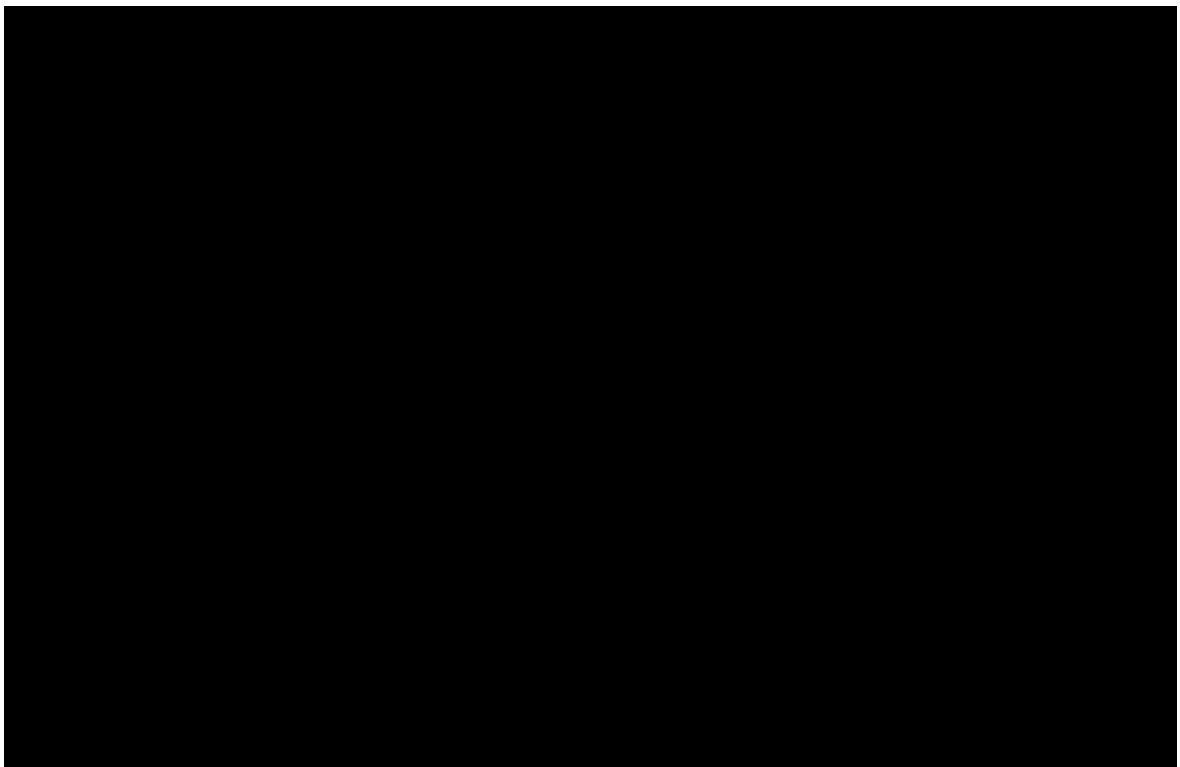


Figura 22. Cuantificación de los efectos de diversos aminoglucosidos sobre la producción de transcriptos subgenómicos. Los diversos transcritos subgenómicos identificados por sus tamaños aproximados (número de nucleótidos, nt) obtenidos después de una transcripción *in vitro* en presencia de diversos aminoglucósidos (Figura 22) fueron cuantificados y graficados. El eje de las ordenadas indican al transcrito y su tamaño aproximado y el eje de las abscisas la cantidad de radioactividad de las bandas medidas en unidades arbitrarias (Cuentas).

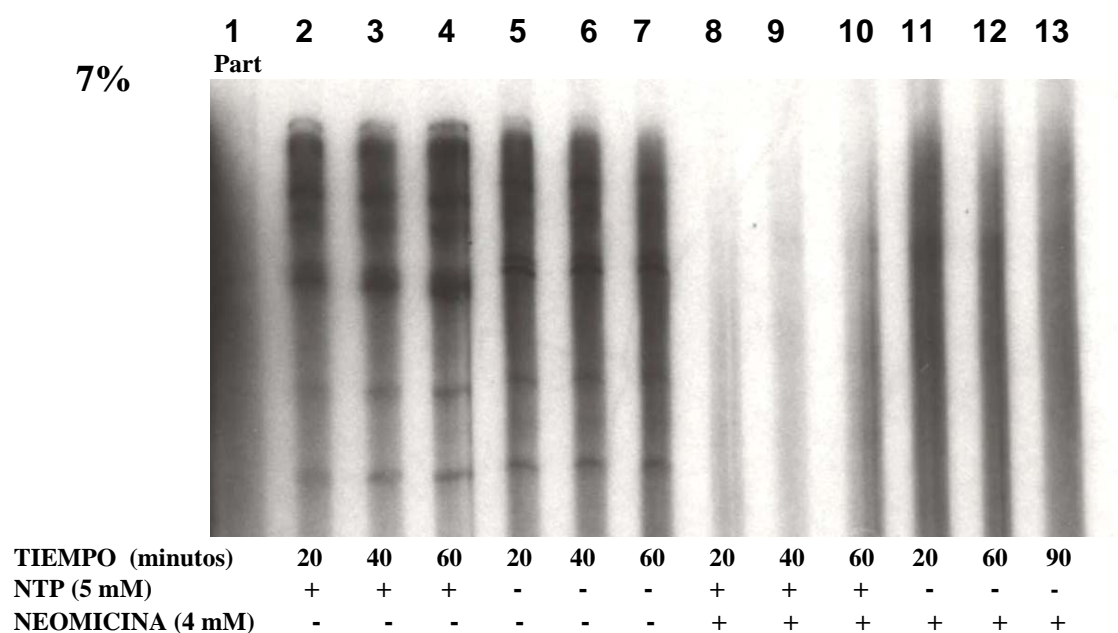


Figura 23. Neomicina B afecta la elongación de transcriptos pequeños.- Autorradiografía de gel de poliacrilamida - 8M urea - TBE 7% donde fueron analizados los productos de transcripción *in vitro*, utilizando subpartículas de doble cubierta de rotavirus SA11-4F, incubadas en presencia (carriles 2 al 4 y del 8 al 10) y ausencia de nucleótidos (carriles 5 al 7 y del 11 al 13), y de 4 mM de neomicina B (carriles 8 al 13). Las subpartículas virales utilizadas, fueron previamente aisladas de la mezcla de reacción final de una transcripción *in vitro* incubada por 20 minutos bajo las condiciones indicadas en métodos, en presencia de [α^{32} P]UTP. NTP= nucleótidos; Part, indica a la muestra de partícula aislada después de la primera transcripción *in vitro*.

V. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se ha estudiado los eventos de la replicación y transcripción del rotavirus, utilizando a los aminoglucósidos con inhibidores de estos eventos, por su capacidad de unirse específicamente a RNAs con estructuras secundarias de origen viral. Estos aminoglucósidos tienen efectos secundarios durante su uso prolongado y en alta dosis cuando son empleados en forma terapéutica asociado a efectos citotóxicos sobre células renales (Mingeot-Leclercq y Tulkens, 1999); sin embargo, las concentraciones de neomicina B que fueron utilizados en los experimentos del presente trabajo, demostraron actividad antiviral (4.5 mM) sin tener efecto citotóxico. Este resultado fue similar al reportado en células provenientes de riñón de hamster (BHK) en donde a concentraciones de 5mM de neomicina B no se observaron alteraciones en la producción de proteínas celulares, ni alteraciones histopatológicas (Langeland y col., 1987).

En las células MA104, el efecto citotóxico de la neomicina B se empieza a evidenciar cuando se le expuso a concentraciones mayores de 6 mM, en donde se observa un aumento en la mortalidad celular (Figura 2). Este efecto se debió en parte, a la baja de pH que se observa en el medio de cultivo, ya que cuando se le agregó bicarbonato de sodio al medio y se reguló el pH a 7.2, se observó una menor muerte celular (datos no mostrados), existiendo reportes afirmando que concentraciones de

5mM hasta 50mM de neomicina B diluidos en el medio de cultivo tamponado pH 7.2 no tienen efecto citotóxicos sobre células BHK (Herold y Spear, 1994). La mortalidad de células cultivadas con altas concentraciones de neomicina B, están relacionadas a la inhibición de los eventos mediados por fosfoinositol, debido a la unión del aminoglucósido a este lípido, inhibiendo su hidrólisis (Carney y col., 1985; Schacht, 1976).

A pesar de que la línea celular MA104 es proveniente de células renales de mono, y en donde se ha demostrado que los aminoglucósidos tienen su mayor efecto tóxico (nefrotóxico) a concentraciones 10 veces mayores que la dosis terapéutica antibacteriana (Recht y col, 1999), muestran una susceptibilidad a los aminoglucósidos similares a los cultivos de queratocitos de humanos, que no son muy susceptibles al efecto tóxico del aminoglucósido (Pastore y col., 1995).

Determinada la inocuidad de la neomicina B en las concentraciones requeridas, sobre las células MA104, se empleó este aminoglucósido en la prueba de reducción de unidades formadoras de placa (UFP) de rotavirus, para determinar la acción contra la multiplicación de rotavirus. La reducción en un 90 % de UFP a una concentración de 4.5 mM de neomicina B nos indica que tiene propiedades antivirales con un efecto muy similar al obtenido sobre los citomegalovirus, en donde una concentración de 5 mM inhibe en un 98% la infección en fibroblastos de origen humano (Lobert y col., 1996), a pesar de que son virus con características biológicas distintas y están ubicados en distintas familias virales. Sin embargo, esta prueba no permite diferenciar que evento o eventos del ciclo viral, están siendo afectados.

Las células tratadas con neomicina B antes de la infección viral, y las que fueron incubadas con neomicina B solo durante la absorción viral, pudieron ser infectada por

la cepa SA11 4F de rotavirus (Figura 2), indicando que la neomicina B no afecta los mecanismos de adherencia y penetración del rotavirus a las células MA104. Este resultado, es contrario a lo que ocurre en la acción antiviral de la neomicina B contra los Herpesvirus simplex tipo 1 (HVS1), en donde inhibe la penetración viral bloqueando la unión del virus a través de la glicoproteína gC con su receptor celular que esta asociado al sistema de transducción de señales del fosfoinositol (PI-3). La neomicina B tiene la propiedad de interactuar con el fosfoinositol produciendo un bloqueo en los procesos celulares mediados por este fosfolípido, como son la transducción de señales, exocitosis y activación de canales iónicos de la membrana (Lipsky y Lietman, 1982). La activación de este sistema de transducción de señales es requerido para provocar la penetración del Herpesvirus simplex dentro de la célula (Langeland y col., 1987). Esta forma de penetración viral parece ser muy distinta a la del rotavirus, en donde aún no se ha encontrado un receptor celular específico para las diversas cepas de rotavirus; existiendo cepas con adherencia y penetración viral dependiente de receptores constituidos de ácido siálico; sin embargo, existen cepas con unión ácido siálico independiente (Ciarlet y col., 2001), sugiriéndose más de un tipo de receptor (Guerrero y col., 2000). Por los resultados obtenidos, se sugiere que neomicina B no afecta la unión del rotavirus con su receptor o receptores celulares, y esto contrasta por ejemplo, con lo que ocurre con lectinas, que producen una reducción de UFP durante la infección de la cepa SA11 en células MA104, impidiendo la unión y penetración viral. Estos compuestos tienen una unión específica a galactosa, sugiriendo este azúcar debe ser un componente importante en el receptor de rotavirus en este tipo de células (Jolly y col., 2000).

La presencia de neomicina B en el medio de cultivo después de la adsorción viral, a diferencia de cuando esta presente antes o durante la adsorción viral, tiene la capacidad de inhibir la síntesis de dsRNA viral (figura 2); lo que nos indica que la

neomicina B, esta actuando en los eventos del ciclo viral posterior a la penetración viral. Este proceso es similar a lo que ocurre en el ciclo viral de cepas de Herpesvirus simplex no dependientes de la unión de la glicoproteína gC a su receptor celular, en donde se sigue un efecto inhibitorio sobre la multiplicación viral posterior a la penetración viral (Herold y Spear, 1994).

La ausencia de detección de dsRNA viral en las células infectadas con rotavirus cuando son cultivadas con un medio conteniendo una concentración de 4.5 mM de neomicina B (figura 3), indica que este aminoglucosido está inhibiendo su síntesis; sin embargo, no permite determinar si se está afectando la síntesis de mRNA (transcripción) o la síntesis de la hebra negativa, para formar el genoma viral de dsRNA, si se tiene en cuenta que la replicación del dsRNA viral está estrechamente relacionada a la transcripción viral, debido a que los mRNA virales son los planteados para la síntesis de la hebra negativa y constituir los dsRNA virales.

En los ensayos de replicación *in vitro* utilizando “open cores” virales, en donde se sintetizan nuevos dsRNA virales a partir de los dsRNA presentes en los “open cores”, se observó un efecto inhibitorio gradual de la replicación con concentraciones crecientes de neomicina B. Este proceso muestra ser altamente sensible, produciéndose una inhibición casi completa a concentraciones 125 μ M de neomicina (figura 4). Esta actividad antiviral es similar a la observada en la replicación del virus de la inmunodeficiencia adquirida de humanos (VIH) donde se impide la síntesis de mRNA virales completos (conteniendo la información de los genes pol, env y gag del retrovirus) por la capacidad que tiene la neomicina B de unirse a la región TAR del RNA viral que es una región reguladora de la síntesis de los diversos tipos de mRNA virales que se observan en el proceso replicativo del VIH (Wang y col., 1998).

En el sistema de replicación *in vitro* utilizado en el presente trabajo, no se puede determinar el mecanismo exacto de la formación de la hebra negativa, debido a que no permite diferenciar si la hebra negativa formada de novo va desplazando a la hebra negativa antigua formando la dsRNA viral o si teniendo como templado la dsRNA genómico, se forma una hebra positiva (mRNA) que sirve como templado para la síntesis de una nueva hebra negativa y constituyen un dsRNA viral. Por este motivo, el efecto inhibitorio de la neomicina B puede deberse a dos posibles causas, que la neomicina este impidiendo la síntesis de la hebra positiva teniendo como templado la dsRNA viral, o afectando la síntesis de la hebra negativa teniendo como molde la cadena positiva formada en novo. Una de las formas de impedir la síntesis de la hebra positiva sería uniéndose a ciertas regiones de la dsRNA viral e impidiendo la acción helicasa de la polimerasa viral, debido a que la neomicina B posee la capacidad de unirse al surco mayor de cadenas de dsRNA sintetizadas *in vitro* y estabilizar al RNA duplex contra la denaturación termal (Kaul y Pilch, 2002); igualmente, en otros aminoglucósidos, como la lividomicina y tobramicina también se les ha demostrado la capacidad de unirse al surco mayor de RNA duplex (Chen y col., 1997; Jin y col., 2000). Por otra parte, se tienen evidencias que los mRNA de rotavirus tienen extremos no codificables (UTR) estructurados y que participan en la señalización y especificidad de la interacción con las proteínas del core viral (Barro y col., 2001), por lo que se podría sugerir que la neomicina B se una a estas regiones estructuradas del mRNA viral y afectar la síntesis de la cadena negativa ya que está demostrado que la neomicina B se une a regiones de RNA estructurado de tipo tallo-orquilla (Wang y col., 1998). Se ha determinado que los genomas de los virus RNA son estructurados y que estas estructuras son señales para el reconocimiento e interacción con sus proteínas (Fodor y col., 1994; Yu y col., 1999).

Los open cores tienen la capacidad de sintetizar una hebra negativa teniendo de templado un mRNA viral de rotavirus agregado al sistema de replicación *in vitro* (replicación exógena), en donde también hay replicación endógena y las cuales son cuantificables; pero cuando se le agrega neomicina B al sistema, se observa una inhibición en la formación de dsRNA viral teniendo como templado al mRNA exógeno, en forma dependiente de la concentración de neomicina B. Esto nos estaría indicando que la neomicina afecta la síntesis de la hebra negativa. En el sistema de replicación *in vitro* en presencia de mRNA exógeno, se observa una mayor eficiencia de replicación del mRNA exógeno que del dsRNA endógeno (del open core), (figura 6, carril 2); sin embargo, en presencia de neomicina B, el efecto inhibitorio es observado principalmente sobre el mRNA exógeno, produciéndose un aumento de síntesis de dsRNA teniendo como el dsRNA endógeno. A mayores concentraciones de neomicina B, hay un efecto inhibitorio para la síntesis de dsRNA viral desde ambos templados (endógeno y exógeno) indicando que la neomicina podría tener más de un mecanismo para inhibir la replicación de rotavirus.

Con estos datos podemos hipotetizar que la neomicina estaría afectando la interacción entre el mRNA y las proteínas del core viral. Se ha demostrado que la neomicina B se une a regiones específicas del RNA, produciendo un estado de competencia con proteínas que se unen específicamente a estas regiones (Zapp y col., 1993; Wang y col., 1998). Ha sido demostrado que el efecto inhibitorio de la replicación en retrovirus, por los aminoglucosidos, es producido por su capacidad de interactuar con la región TAR del RNA viral. En esta región, donde normalmente se une la proteína reguladora viral Tat, se encuentra una estructura tallo horquilla en donde se han identificado elementos que interactúan con la neomicina B (Faber y col., 2000). Un mecanismo similar, podría estar sucediendo entre los RNA mensajeros de rotavirus y la neomicina B, debido a que están siendo identificados estructuras tipo

tallo horquilla en su región 3' y se ha postulado que ellas son requeridas para la iniciación de la síntesis de cadena negativa (Barro y col., 2001; Patton y col., 1999; Patton y Spencer, 2000). Previos reportes, muestran que la delección de nucleótidos, modificación de bases o uso de oligonucleótidos antisentidos de esta región, afectan la habilidad del mRNA para actuar eficientemente como un templado (Barro, 2001), determinando su importancia en la síntesis de la cadena negativa.

Los resultados de los experimentos que utilizan mRNA exógeno en el sistema de replicación (figuras 6 y 7) indican que los open cores reconocen alguna señal en los mRNAs por la cual tendría una mayor afinidad con relación a las señales presentes en el dsRNA genómico. Esta diferencia estaría determinada por las características estructurales propias de ambos tipos de moléculas. Estudios de estructuras secundarias de los mRNAs virales predicen que sus seis últimas bases se encuentran desapareadas terminando en la secuencia CCA en el extremo 3' a diferencia del dsRNA viral y la otra diferencia es la posible presencia de una estructura de tallo y horquilla en el extremo 3'- de todos los mRNAs virales (Barro y col., 2002). Estas características estructurales de los mRNAs de rotavirus también están presentes en otras moléculas de RNA como son los tRNAs de levadura (Quigley y col., 1978), y que por lo tanto podrían interferir en la síntesis de la hebra negativa en la replicación endógena, cuando son agregadas en el sistema de replicación con open cores. Los resultados mostrados en la figura 9 muestran que los tRNAs de levadura inhiben eficientemente el uso de dsRNA endógeno, similar a los resultados obtenidos por Barro (2002) en donde encontró además que a concentraciones similares es incapaz de inhibir la síntesis de hebra negativa en presencia de mRNA de rotavirus exógeno como molde. En ese mismo estudio, se sugiere que la estructura del tRNA es de importancia en la eficiencia de competir por la molécula de polimerasa con el dsRNA molde pero no con aquella señal presente en cada uno de los 11 mRNAs virales, esta

sugerencia es reforzada con los experimentos de este estudio en donde concentraciones micromolares de neomicina interfiere con el efecto inhibitorio del tRNA sobre el uso de dsRNA endógeno, observándose un aumento de síntesis, sobre todo de los dsRNA virales de mayor tamaño (Figura 10, carriles 5 al 7), e indicando una interacción entre el tRNA de levadura y la neomicina B, similar a lo reportado por Kirk y Tor (1999), donde determinaron la unión de tRNA de la fenilalanina con la neomicina B. Todas estas evidencias indican que la estructura del extremo 3'-presente en el molde es una señal de reconocimiento importante involucrada en la síntesis de la hebra negativa.

Usando análogos de nucleótidos como 2'3' dialdehído ATP, en el sistema de replicación *in vitro* se observa una inhibición de la síntesis de dsRNA viral (figura 8, carriles 2 y 8). Esta actividad no es evidenciada cuando se agrega mRNA viral en forma exógena al sistema, en donde se forma dsRNA teniendo como molde a este mRNA añadido. Si tenemos en cuenta que este análogo inhibe la transcripción de rotavirus *in vitro* y que se une con la VP3, proteína con actividad guanidil y metil transferasa, formando un complejo estable (Pizarro y col., 1991). Este análogo estaría afectando la síntesis de la hebra positiva en el sistema. Esta evidencia, junto a la que los open cores, pueden sintetizar dsRNA *de novo* a partir de dsRNA viral añadido en forma exógena al sistema (Barro, 2002), nos indicaría que el sistema de replicación *in vitro* utilizado, tendría la capacidad de sintetizar mRNA viral *de novo* desde el dsRNA genómico; sin embargo, no se puede descartar que partículas de doble cubiertas, las cuales tienen comprobada actividad de sintetizar RNA de simple hebra, se mantengan en el sistema, siendo los que aportan los RNA de simple hebra al sistema.

La unión de la neomicina al mRNA viral, se observó indirectamente al comprobar que la neomicina protegió a diversas regiones del mRNA viral a la acción de la

nucleasa micrococcal (figura 10). Contrario a lo que se esperaba, suponiendo que la neomicina se unía a una región específica, se observó que las regiones de mRNA protegidos tuvieron diversos tamaños. Una de las razones de este resultado, sería que se utilizó una mezcla de los 11 mRNA virales para ser incubados con la nucleasa micrococcal, los cuales pueden dar al menos hasta 11 tipos de segmentos de mRNA protegidos. Otra razón, no necesariamente excluyente de la anterior, es que existan diversos lugares de unión a neomicina B en un mismo fragmento de mRNA. Se sospecha que el mRNA del rotavirus conforma diversas estructuras secundarias, sobre todo en sus extremos UTR (regiones no traducibles) conteniendo señales necesarias para su unión con las proteínas virales para realizar la replicación viral y encapsidación (Patton y Spencer, 2000). Los análisis bioinformáticos predicen que estos extremos son altamente estructurados, pudiendo existir la unión de los extremos 3' y 5' en un mRNA completo como se observa en virus de influenza (Fodor y col., 1994) y la predicción de la presencia de estructuras tipo tallo horquilla en el extremo 3' de los mRNAs de rotavirus (Chen y Patton, 1998), muy similares a los RNA estructurados en donde se unen los aminoglucósidos (Schroeder y col., 2000).

El análisis de inhibición de replicación de cada uno de los segmentos genómicos (figura 13) determinó que existen distintos grados de sensibilidad a la neomicina B, esto debido tal vez a que existen distintas estructuras secundarias en los UTR de los 11 segmentos de mRNA viral y que las de los segmentos 4, 6 y 2-3 tienen estructuras con mayor afinidad de unión a la neomicina B, a diferencia del 1 y 11 que muestran menor afinidad, a pesar que todos tienen secuencias consenso que están determinadas a ser promotoras de la replicación (Chen y Patton, 1998). En la unión entre los aminoglucósidos y el RNA hay una interacción entre las cargas positivas de los grupos aminos del aminoglucósido y las cargas negativas netas de los fosfatos presentes en los surcos del RNA, ya que los aminoglucósidos se unen más a ciertos

requerimientos estructurales de RNA que a secuencias determinadas. (Sastrasinh y col., 1982; Schibeci y Schacht, 1977); así, la diferencia de susceptibilidad entre las células bacterianas y células eucariotas a los aminoglucosidos se deben a la mayor afinidad de unión al 16 S ribosomal bacteriano que al RNA ribosomal eucarionte por su distinta conformación haciéndolas resistentes a dosis terapéuticas (Kotra y col., 2000). Los distintos grados de susceptibilidad a la neomicina B indicarían una variación de estructuras en los extremos 3' de los mRNA de rotavirus. Se presume que estas diversas estructuras serían señales para la identificación y encapsidación de los 11 segmentos que conforman el genoma viral de un nuevo virión (Patton y Spencer, 2000). El efecto sobre la transcripción siguió una respuesta dosis dependiente: En efecto, la inhibición fue mas intensa a altas concentraciones de neomicina B (figuras 13 y 14), indicando que la síntesis de dsRNA es más sensitiva a los aminoglucosidos que la transcripción. Se ha visto que la transcripción viral, catalizada por la partícula activada, ocurre en dos pasos: el primero es la transcripción inicial de cortos oligonucleotidos de 6 a 22 bases de largo que permanecen asociados a la partícula viral (Figuras 16 y 17), y segundo, estos oligonucleótidos son posteriormente elongados a transcritos completos como se observa en la figura 18. Estudios anteriores también reconocen la presencia de una pausa durante la transcripción con producción de transcritos de 6 y 9 nucleótidos de largo que son posteriormente elongados (Lawton y col., 2001). La adición de neomicina B afecta ambos pasos, la síntesis de los RNA pequeños (figura 19), y la elongación de estos productos para producir mRNA de tamaño completo (figura 23), y por lo tanto se puede considerar un efecto directo sobre la maquinaria transcripcional. Este efecto es análogo al de otros aminoglucósidos probados, tal como se observa en la cinética de inhibición de transcripción de la síntesis de mRNA (figura 12). Además, también se observó una inhibición de síntesis de los transcritos pequeños (figura 22) aunque con distintos grados de inhibición, siendo la neomicina la de mayor efecto inhibitorio, similar a lo

observado en la inhibición de la ribozima del virus de la hepatitis delta, donde se determinó que la neomicina tiene un mayor efecto que los otros aminoglucosidos (Rogers y col., 1996). Esto estaría relacionado a la estructura molecular de la neomicina, donde sus 6 residuos aminos protonados le permitirían interactuar con estructuras de RNA con cargas netas negativas (Hermann y Westhof, 1999). La kanamicina muestra estructuralmente tres anillos ciclicos, mientras que la neomicina B y paromomicina tienen 4; esta variación estructural podría ser la responsable de que la kanamicina no tenga efecto inhibitorio sobre la transcripción.

Se ha determinado que la neomicina y otros aminoglucosidos inhiben a las ribozimas virales y el autoclivaje de los intrones tipo I. Se ha especulado que esta inhibición se debería a la competencia con iones Mg^{2+} que se unen a estas regiones del RNA (Mikkelsen y col., 1999). Sin embargo, el efecto inhibitorio en la transcripción de rotavirus parece ser distinta porque, cuando se realizaron experimentos aumentando el contenido de iones Mg^{2+} en la mezcla de transcripción *in vitro*, la inhibición de síntesis de los transcriptos por la neomicina B permaneció constante, si se compara con la cantidad de transcriptos producidos en los controles (figura 14). La gráfica de la síntesis de transcriptos en las transcripciones *in vitro* conteniendo concentraciones crecientes de Mg^{2+} indican que existe una concentración ideal para la actividad de la polimerasa viral y que concentraciones mayores son inhibitorias también para la síntesis de mRNAs.

Los resultados *in vitro* evidencian que hubo inhibición de síntesis de dsRNA viral, indicando que este paso es afectado por la neomicina B, sin embargo, este efecto *in vivo* podría ser debido a la inhibición de la transcripción viral puesto que es un proceso temprano observado después de penetración viral y requerido para producir el templado para la síntesis de cadena negativa.

El sulfato de neomicina es un compuesto soluble que se distribuye en el citoplasma, sin embargo, en una célula infectada con rotavirus, se forma una estructura viral denominada viroplasma en donde se encuentran altas concentraciones de proteínas virales y ácidos nucleicos virales en formación (Gonzalez y col., 2000; Fabbretti y col., 1999), por lo tanto la distribución de la neomicina puede ser mucho menor en esta organización intracelular, lo que impediría la inhibición de los procesos que ocurren al interior de dicha estructura.

Los hallazgos presentados en esta tesis, indican que la neomicina inhibe la síntesis de la hebra negativa en el proceso de replicación de rotavirus *in vitro* y sugieren que esta inhibición se debe a la unión de la neomicina a ciertas regiones de los RNA mensajeros de rotavirus debido a la protección de la acción de RNasa micrococcal por parte de la neomicina. Además, la reconocida afinidad de unión de la neomicina a RNA estructurado, junto con los resultados de la inhibición de la replicación y la afinidad de unión al tRNA de levaduras, sugieren que existen señales de tipo estructural en el mRNA de rotavirus que son esenciales para la síntesis de la hebra negativa, reafirmando los indicios obtenidos en otros estudios (Barro, 2002). Por otro lado, también se ha demostrado que la neomicina afecta la transcripción *in vitro* de rotavirus sugiriendo una unión de la neomicina B con alguna región de la dsRNA viral, y por lo tanto, determinando que la neomicina tiene una capacidad de unión con distintos tipos de RNA virales siendo no específica a una determinada estructura secundaria presente en estos RNA, que permitiría un uso como inhibidor específico de la replicación viral. Sin embargo, existen investigaciones sobre los diversos grados de afinidad de los aminoglucósidos naturales y moléculas sintéticas derivadas a diversas estructuras secundarias de RNA que vislumbran que puedan obtenerse compuestos con capacidades antivirales contra virus con genoma de tipo RNA.

VI. CONCLUSIONES

- 1.- La neomicina es un inhibidor de la multiplicación del rotavirus en células MA 104, impidiendo la formación de dsRNA genómico.
- 2.- La neomicina B no afecta la absorción viral
- 3.- La neomicina B inhibe la replicación in vitro de los 11 segmentos genómicos de rotavirus, pero aparentemente cada segmento tiene una susceptibilidad diferente a una determinada concentración del inhibidor.
- 4.- La neomicina B inhibe la síntesis de la hebra negativa y la síntesis de la hebra positiva (mRNA) del rotavirus. Sin embargo parece ser mayor su efecto sobre la síntesis por la hebra negativa por su mayor afinidad de unirse al mRNA rotaviral.
- 5.- Los ensayos de protección del mRNA viral a la acción de la nucleasa micrococal, indicarían que la neomicina inhibe la síntesis de la hebra negativa uniéndose a algunas regiones del mRNA.
- 6.- Los aminoglucosidos estudiados con la excepción de la kanamicina tienen la capacidad de inhibir la transcripción del rotavirus desde el inicio de la transcripción, sin competir con el catión magnesio necesario para la actividad transcriptasa de la enzima viral.
- 7.- Durante el inicio de la transcripción se observan pequeños transcritos subgenómicos unidos a partículas subvirales que son precursores de los mRNA rotavirales completos

VII. BIBLIOGRAFÍA

- 1- **Aboul-ela F, Karn J, Varani G. 1996.** Structure of HIV-1 TAR RNA in the absence of ligands reveals a novel conformation of the trinucleotide bulge. *Nucleic Acids Res.* 24: 3974 - 3981.
- 2- **Aponte C, Poncet D, Cohen J. 1996.** Recovery and characterization of a replicase complex in rotavirus-infected cells by using a monoclonal antibody against NSP2. *J. Virology.* 70(2):985-991.
- 3- **Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore D, Seidman J, Smith J, Struhl K. 1994.** *Current Protocols in Molecular Biology.* Ed. John Wiley & Sons. Inc. USA.
- 4- **Barber SA, Flaherty MT, Plafker SM, Clements, JE. 1998.** A novel kinase activity associated with Nef derived from neurovirulent simian immunodeficiency virus. *Virology* 251: 165-175.
- 5- **Barro M, Mandiola P, Chen D, Patton JT, Spencer E. 2001.** Identification of sequences in rotavirus mRNAs important for minus strand synthesis using antisense oligonucleotides. *Virology* 15;288(1):71-80.
- 6- **Barro M. 2002.** Función de la estructura secundaria del RNA mensajero en la replicación del genoma del rotavirus. Tesis para optar el grado de doctor en ciencias mención Biología. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias. Santiago. 2000. 100p.
- 7- **Bern C, Martines J, de Zoysa I, Glass RI. 1992.** The magnitude of the global problem of diarrhoeal disease: a ten year update. *Bull World Health Organ.* 70:705-714.
- 8- **Bican P, Cohen J, Charpilienne A, Scherrer R. 1982.** Purification and characterization of bovine rotavirus cores. *J. Virol.*, 43: 1113 - 1117.
- 9- **Boyle J, Holmes K. 1986.** RNA-binding proteins of bovine rotavirus. *J Virology*, 58(2):561-568.

- 10- **Bradford MM. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of proteins utilising the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- 11- **Chen D, Patton J. 1998.** Rotavirus RNA replication requires a single-stranded 3' end for efficient minus-strand synthesis. *J. Virol.* 72(9): 7387-7396.
- 12- **Chen D, Barro M, Spencer E, Patton JT. 2001.** Features of the 3'-consensus sequence of rotavirus mRNAs critical to minus strand synthesis. *Virology* 282:221-229.
- 13- **Chen D, Zeng C, Wentz M, Gorziglia M, Estes M, Ramig R. 1994.** Template-dependent, in vitro replication of rotavirus RNA. *J Virology.* 68:7030-7039.
- 14- **Chen D, Ramig R. 1992.** Determinants of rotavirus stability and density during CsCl purification. *Virology.* 186:228-237.
- 15- **Chen Q, Shafer R, Kuntz I. 1997.** Structure- based discovery of ligands targeted to the RNA double helix. *Biochemistry.* 36:11402-11407.
- 16- **Chnaiderman J, Barro M, Spencer E. 2002.** NSP5 phosphorylation regulates the fate of viral mRNA in rotavirus infected cells. *Arch Virol.*147(10):1899-911.
- 17- **Ciarlet M, Crawford SE, Estes MK. 2001.** Differential infection of polarized epithelial cell lines by sialic acid-dependent and sialic acid-independent rotavirus strains. *J Virol.* 75(23):11834-50.
- 18- **Cohen J, Laporte J, Charpilienne A, Scherrer R. 1979.** Activation of rotavirus RNA polymerase by calcium chelation. *Arch Virol.* 60(3-4):177-86.
- 19- **Coulson BS. 1996.** VP4 and VP7 typing using monoclonal antibodies. *Arch Virol Suppl.* 12:113-8.
- 20- **Coulson BS, Londrigan SL, Lee DJ. 1997.** Rotavirus contains integrin ligand sequences and a disintegrin-like domain that are implicated in virus entry into cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 13;94(10):5389-94.
- 21- **Chapman M, Rao A, Cheng C. 1998.** Sequences 5' of the conserved tRNA-like promoter modulate the initiation of minus-strand synthesis by the Brome Mosaic Virus RNA-dependent RNA polymerase. *Virology* 252:458-467.
- 22- **Chemello ME, Aristimuño OC, Michelangeli F, Ruiz MC.2002.** Requirement for vacuolar H⁺ -ATPase activity and Ca²⁺ gradient during entry of rotavirus into MA104 cells. *J Virol.* 76(24):13083-7.
- 23- **Cho J, Rando R. 1999.** Specificity in the binding of aminoglycosides to HIV-RRE RNA. *Biochemistry* 1999, 38:8548-8554.

- 24- **Deiman B, Verlaan P, Pleij C. 2000.** In vitro transcription by the Turnip yellow mosaic virus RNA polymerase: a comparison with the Alfalfa mosaic virus and Brome mosaic virus replicases. *J. Virology* 74(1):264-271.
- 25- **Dodet B, Heseltine E, Saliou P. 1997.** Rotaviruses in human and veterinary medicine. *Trends Microbiol.* 1997, 5(5):176-8.
- 26- **Eiden JJ, Hirshon C. 1993.** Sequence analysis of group B rotavirus gene I and definition of rotavirus-specific sequence motif within the RNA polymerase gene. *Virology* 192(1):154-60.
- 27- **Estes MK. 1996.** Rotaviruses and their replication, p.731-761. In B.N. Fields, D. Knipe, Howley, et al. (ed.), *Fundamental Virology*, 3rd ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA.
- 28- **Faber C, Sticht H, Schweimer K, Rösch P. 2000.** Structural rearrangements of HIV-1 Tat-responsive RNA upon binding of neomycin B. *J Biol Chem.* 2000, 7; 275(27):20660-6.
- 29- **Fabbretti E, Afrikanova I, Vascotto F, Burrone OR.1999.** Two non-structural rotavirus proteins, NSP2 and NSP5, form viroplasm-like structures in vivo. *J Gen Virol.* 80(2):333-9.
- 30- **Falconer MM, Gilbert JM, Roper AM, Greenberg HB, Gavora JS. 1995.** Rotavirus-induced fusion from without in tissue culture cells. *J Virology.* 69(9):5582-91
- 31- **Fodor E, Pritlove D, Brownlove G.1994.** The influenza virus panhandle is involved in the initiation of transcription. *J Virology* 68:4092-4096.
- 32- **Fourmy D, Recht M, Puglisi J. 1998.** Binding of Neomycin-class aminoglycoside antibiotics to the A-site of 16 S rRNA. *J. Mol. Biol.* 277:347-362.
- 33- **Fukudome K, Yoshie O, Konno T. 1989.** Comparison of human, simian and bovine Rotaviruses for requirement of sialic acid in hemagglutination and cell adsorption. *Virology* 172: 196-205.
- 34- **Fukuhara N, Nishikawa K, Gorziglia M, Kapikian, AZ. 1989.** Nucleotide sequence of gene segment 1 of a porcine rotavirus strain. *Virology.* 173: 743-749.
- 35- **Gallegos CO, Patton JT. 1989.** Characterization of rotavirus replication intermediates: a model for the assembly of single-shelled particles. *Virology* 172(2):616-27.
- 36- **González RA, Torres-Vega MA, López S, Arias CF. 1998.** In vivo interactions among Rotavirus nonstructural proteins. *Arch. Virol.* 143: 981-996.
- 37- **Guerrero CA, Zarate S, Corkidi G, Lopez S, Arias CF. 2000.** Biochemical characterization of rotavirus receptors in MA104 cells. *J Virol.* 74(20):9362-71.

- 38- **Guerrero CA, Méndez E, Zárate S, Isa P, López S, Arias CF. 2000.** Integrin $\alpha_v\beta_3$ mediates rotavirus cell entry. PNAS. 2000, 97: 14644 - 14649.
- 39- **Helmberger-Jones M, Patton JT. 1986.** Characterization of subviral particles in cells infected with simian rotavirus SA11. Virology 155(2):655-65
- 40- **Hermann T, Westhof E. 1999.** Docking of cationic antibiotics to negatively charged pockets in RNA folds. J Med Chem. 1999, 42(7):1250-61.
- 41- **Herold BC, Spear PG. 1994.** Neomycin inhibits glycoprotein C (gC)-dependent binding of herpes simplex virus type 1 to cells and also inhibits postbinding events in entry. Virology 15;203(1):166-71.
- 42- **Herring AJ, Inglis NF, Ojeh CK, Snodgrass DR, Menzies JD. 1982.** Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver stained polyacrylamide gels. J. Clin. Microbiol. 16: 473-477.
- 43- **Hoshino Y, Wyatt RG, Greenberg HB, Kalica AR, Flores J, Kapikian AZ. 1983.** Serological comparison of canine rotavirus with various simian and human rotaviruses by plaque reduction neutralization and hemagglutination inhibition tests. Infect Immun. 1;41(1):169-73.
- 44- **Huang RC, Panin M, Romito RR, Huang YT. 1994.** Inhibition of replication of human respiratory syncytial virus by 6-diazo-5-oxo-L-norleucine. Antiviral Res. 1994; 25(3-4):269-79.
- 45- **Imai M, Akatami K, Ikegami N, Furuichi Y. 1983.** Capped and conserved terminal structures in human rotavirus double-stranded RNA segments. J. Virology. 47: 125-136.
- 46- **James V, Lambden P, Deng Y, Caul E, Clarke I. 1999.** Molecular characterization of human group C rotavirus genes 6, 7, and 9. J General Virology. 80:3181-3187.
- 47- **Jin E, Katritch V, Olson WK, Kharatisvili M, Abagyan R, Pilch DS. 2000.** Aminoglycoside binding in the major groove of duplex RNA: the thermodynamic and electrostatic forces that govern recognition. J Mol Biol. 21; 298(1):95-110.
- 48- **Jolly CL, Beisner BM, Holmes IH. 2000.** Rotavirus infection of MA104 cells is inhibited by Ricinus lectin and separately expressed single binding domains. Virology. 15;275(1):89-97.
- 49- **Kaljot KT, Shaw RD, Rubin DH, Greenberg HB. 1988.** Infectious Rotavirus enters cells by direct cell membrane penetration, not by endocytosis. J. Virol. 62: 1136-1144.
- 50- **Kaul M, Pilch DS. 2002.** Thermodynamics of aminoglycoside-rRNA recognition: the binding of neomycin-class aminoglycosides to the A site of 16S rRNA. Biochemistry. 18; 41(24):7695-706.

- 51- **Kirk SR y Tor Y. 1999.** tRNA(Phe) binds aminoglycoside antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44(12):3249-56.
- 52- **Kotra LP, Haddad J, Mobashery S. 2000.** Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44(12):3249-56.
- 53- **Laemmli UK. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- 54- **Langeland N, Holmsen H, Lillehaug JR, Haarr L. 1987.** Evidence that neomycin inhibits binding of herpes simplex virus type 1 to the cellular receptor. *J Virol*; 61(11):3388-93
- 55- **Lawton JA, Estes MK, Prasad, B.V. 1997.** Three-dimensional visualization of mRNA release from actively transcribing rotavirus particles. *Nat. Struct. Biol.* 4:118-121.
- 56- **Lawton JA, Estes MK, Prasad BV. 2001.** Identification and characterization of a transcription pause site in rotavirus. *J Virology* 75(4):1632-42.
- 57- **Lipsky JJ, Lietman PS. 1982.** Aminoglycoside inhibition of a renal phosphatidylinositol phospholipase C. *J Pharmacol Exp Ther.* 1982; 220 (2) : 287-92.
- 58- **Lobert PE, Hober D, Delannoy AS, Wattre P. 1996.** Evidence that neomycin inhibits human cytomegalovirus infection of fibroblasts. *Arch Virol* 141(8):1453-1462.
- 59- **Mikkelsen NE, Brännvall M, Virtanen A, Kirsebom LA. 1999.** Inhibition of RNase P RNA cleavage by aminoglycosides. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999, 25;96(11):6155-60
- 60- **Mingeot-Leclercq, MP y Tulkens PM. 1999.** Aminoglycosides: nephrotoxicity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:1003-1012.
- 61- **Pastore S, Shivji GM, Kondo S, Kono T, McKenzie RC, Segal L, Somers D, Sauder DN. 1995.** Effects of contact sensitizers neomycin sulfate, benzocaine and 2,4-dinitrobenzene 1-sulfonate, sodium salt on viability, membrane integrity and IL-1 alpha mRNA expression of cultured normal human keratinocytes. *Food Chem Toxicol*, 33(1):57-68.
- 62- **Patton J, Gallegos CO. 1988.** Structure and protein composition of the Rotavirus replicase particle. *Virology* 166: 358-365.
- 63- **Patton J, Gallegos CO. 1990.** Rotavirus RNA replication: single-stranded RNA extends from the replicase particle. *J Gen Virol.* 71 (Pt 5):1087-94.
- 64- **Patton J. 1995.** Structure and function of the rotavirus RNA-binding proteins. *J. Gen. Virol.* 76: 2633-2644.

- 65- **Patton JT. 1996.** Rotavirus VP1 alone specifically binds to the 3' end of viral mRNA, but the interaction is not sufficient to initiate minus-strand synthesis. *J Virology* 70(11):7940-7.
- 66- **Patton J, Wentz M, Xiaobo J, Ramig F. 1996.** Cis-acting signals that promote genome replication in rotavirus mRNA. *J. Virology* 70(6): 3961-3971.
- 67- **Patton J, Jones M, Kalbach A, He YW, Xiaobo Y. 1997.** Rotavirus RNA polymerase requires the core shell protein to synthesize the double-stranded RNA genome. *J. Virology* 71(12):9618-9626.
- 68- **Patton JT, Chnaiderman J, Spencer E. 1999.** Open reading frame in rotavirus mRNA specifically promotes synthesis of double-stranded RNA:template size also affects replication efficiency. *Virology* 264: 167-171.
- 69- **Patton JT, E Spencer. 2000.** Genome replication and packaging of segmented double-stranded RNA viruses. *Virology* 277:217-225.
- 70- **Petrie B, Greenberg H, Graham D, Estes M. 1984.** Ultrastructural localization of rotavirus antigens using colloidal gold. *Virus Research.* 1:133-152.
- 71- **Piron M, Vende P, Cohen J, Poncet D. 1998.** Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4G1 and evict the poly(A) binding protein from eIF4F. *The EMBO J.* 17(19):5811-5821.
- 72- **Pizarro JL, Sandino AM, Pizarro JM, Fernandez J, Spencer E. 1991.** Characterization of Rotavirus guanylyltransferase activity associated with polypeptide VP3. *J. Gen. Virol.* 72: 325-332.
- 73- **Pizarro JM, Pizarro JL, Fernández J, Sandino AM, Spencer E. 1991 b.** Effect of nucleotide analogues on rotavirus transcription and replication. *Virology* 184(2):768-72.
- 74- **Poncet D, Lindenbaum P, L'Haridon R, Cohen J. 1997.** In vivo and in vitro phosphorylation of Rotavirus NSP5 correlates with its localization in viroplasms. *J. Virology* 71(1): 34-41.
- 75- **Poncet D, Laurent S, Cohen J. 1994.** Four nucleotides are the minimal requirement for RNA recognition by rotavirus non-structural protein NSP3. *The EMBO J.* 13:4165-4173.
- 76- **Prasad BVV, Wang GJ, Clerx JPM, Chiu, W. 1988.** Three-dimensional structure of rotavirus. *J. Mol. Biol.* 199: 269-275.
- 77- **Prasad BVV, Rothnagel R, Zeng CQY, Jakana J, Lawton JA, Chiu W, Estes, MK. 1996.** Visualization of ordered genomic RNA and localization of transcriptional complexes in rotavirus. *Nature* 382:471-473.

- 78- **Quigley GJ, Teeter MM, Rich A. 1978.** Structural analysis of spermine and magnesium ion binding to yeast phenylalanine transfer RNA. *Proc.Natl. Acad. Sci.USA* 75:64-68.
- 79- **Recht MI, Douthwaite S, Puglisi JD. 1999.** Basis for prokaryotic specificity of action of aminoglycoside antibiotics. *EMBO J.* 18:3133-3138.
- 80- **Rogers J, Chang A, Von Ahsen U, Schroeder R, Davies J. 1996.** Inhibition of the self-cleavage reaction of the human hepatitis delta virus ribozyme by antibiotics. *J. Mol. Biol.* 259:916-925.
- 81- **Ruiz MC, Cohen J, Michelangeli F. 2000.** Role of Ca²⁺ in the replication and pathogenesis of rotavirus and other viral infections. *Cell Calcium.* 2000; 28(3):137-49.
- 82- **Sandino AM, Jashes M, Faúndez G, Spencer E. 1986.** Role of the inner protein capsid on in vitro human rotavirus transcription. *J Virol.* 60(2):797-802.
- 83- **Sastrasinh M, Knauss TC, Weinberg JM, Humes HD. 1982.** Identification of the aminoglycosides binding site in rat renal brush border membranes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 222:350-358.
- 84- **Schacht J. 1976.** Inhibition by neomycin of polyphosphoinositide turnover in subcellular fractions of guinea-pig cerebral cortex in vitro. *J Neurochem.* 1976; 27(5):1119-24.
- 85- **Schibeci A, Schacht, J. 1977.** Action of neomycin on the metabolism of polyphosphoinositides in the guinea pig kidney. *Biochem. Pharmacol.* 26:1769-1774.
- 86- **Schroeder R, Waldsich C, Wank H. 2000.** Modulation of RNA function by aminoglycoside antibiotics. *The EMBO J.* 19(1):1-9.
- 87- **Stacy-Phipps S, Patton J. 1987.** Synthesis of plus- and minus-strand RNA in rotavirus-infected cells. *J Virol.* 61(11):3479-84.
- 88- **Spencer E, García B. 1984.** Rol of S-adenosil methonine in human rotavirus transcription. *J. Virology* 52: 188-197.
- 89- **Vaishnav YN, Vaishnav M y Wong-Staal F. 1991.** Identification and characterization of a nuclear factor that specifically binds to the Rev response element (RRE) of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *New Biol.* 1991; 3(2):142-50.
- 90- **Valenzuela S, Pizarro J, Sandino AM, Vásquez M, Fernández J, Hernández O, Patton J, Spencer E. 1991.** Photoaffinity labeling of Rotavirus VP1 with 8-azido-ATP: identification of the viral RNA polymerase. *J. Virology* 65(7): 3964-3967.
- 91- **Vásquez M, Sandino AM, Pizarro J, Fernández J, Valenzuela S, Spencer E. 1993.** Studies on the function of the rotavirus SA-11 VP3 polypeptide on the viral morphogenesis using a termosensitive mutant tsB. *J. of General Virology* 74: 937-941.

- 92- **Vende P, Piron M, Castagné N, Poncet D, 2000.** Efficient translation of rotavirus mRNA requires simultaneous interaction of NSP3 with the eukaryotic translation initiation factor eIF4G and the mRNA 3' end. *J. Virology* 74(15):7064-7071.
- 93- **Von Ahsen U, Davies J, Schroeder R. 1991.** Antibiotic inhibition of group I ribozyme function. *Nature*. 353:368-370.
- 94- **Wang S, Huber P, Cui M, Czarnick A, Mei H. 1998.** Binding of neomycin to the TAR element of HIV-1 RNA induce dissociation of Tat protein by an allosteric mechanism. *Biochemistry* 1998, 37:5549-5557.
- 95- **Wentz M, Patton J, Ramig R. 1996a.** The 3'-terminal consensus sequence of rotavirus mRNA is the minimal promoter of negative-strand RNA synthesis. *J. Virology*. 70(11): 7833-7841.
- 96- **Wentz MJ, Zeng CQ, Patton JT, Estes MK, Ramig RF. 1996b.** Identification of the minimal replicase and the minimal promoter of (-) strand synthesis, functional in rotavirus RNA replication in vitro. *Arch. Virol.* 12:59-67.
- 97- **Yu H, Grassmann CI, Behrens S. 1999.** Sequence and structural elements at the 3' terminus of bovine viral diarrhea virus genomic RNA: functional role during RNA replication. *J. Virology*. 73(5):3638-3648.
- 98- **Zapp M, Stern S, Green M. 1993.** Small molecules that selectively block RNA binding of HIV-1 Rev protein inhibit Rev function and viral production. *Cell* 1993, 74:969-978.

APÉNDICE

ANEXO.

Cuadro A1. Abreviaturas usadas en este estudio

Abreviatura	Definición
RNA	Ácido ribonucleico
dsRNA	RNA de doble hebra
mRNA	RNA mensajero
tRNA	RNA de transferencia
RPR	RNA polimerasa RNA dependiente
UTR	regiones no traducibles
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
MEM	Medio mínimo de EAGLE
M.O.I.	Multiplicidad de infección
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
u.f.p./cél	Unidades formadoras de placas por célula
PPO	2,5-difeniloxazol
POPOP	p-bis[2-(5-fenil oxazolil)] benceno